

EIN VERFAHREN ZUR REINDARSTELLUNG
DES INTER-ALPHA-TRYPSININHIBITORS
UND CHARAKTERISIERUNG
DER BEI DESSEN ZERFALL
AUFTRETENDEN BRUCHSTÜCKE

Lorenz Fischbacher

1982



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549025_0025

Aus dem Biochemischen Laboratorium
(Leitung: Prof. Dr. K. Hochstraßer)
der Hals-Nasen-Ohrenklinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. H. H. Naumann

EIN VERFAHREN ZUR REINDARSTELLUNG
DES INTER-ALPHA-TRYPSININHIBITORS
UND CHARAKTERISIERUNG DER BEI DESSEN ZERFALL
AUFTRETENDEN BRUCHSTÜCKE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Lorenz Fischbacher

aus
Rosenheim

1981

Mit Genehmigung
des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Hochstraßer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. H. Naumann
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann



Tag der mündlichen Prüfung: 28.1.1982

Meinen Eltern
mit herzlichem Dank
gewidmet

INHALTSANGABE

	Seite
I. EINLEITUNG	1
II. THEORETISCHER TEIL	3
A) Proteine und Proteasen	3
B) Proteinaseinhibitoren	3
C) Hemm-Mechanismen bei Proteinaseinhibitoren	4
D) Proteinaseinhibitoren des menschlichen Serums	5
E) Der Inter-Alpha-Trypsininhistor	8
1. Physikalische und chemische Eigenschaften	8
2. Stabilität	9
3. Spezifität	10
4. Kinetische Eigenschaften	11
5. Verteilung	11
6. Phylogenese	11
7. Reinigungsverfahren	11
8. Beziehung zu anderen Inhibitoren	12
9. Physiologie	15
10. Pathologie	16
III. ANGEWANDTE METHODEN	18
A) Ionenaustauschchromatographie auf DEAE SH 23	18
B) Ammonsulfatfällung	21
C) Gelfiltration auf Sephadex G 200	23
D) Affinitätschromatographie an Con-A-Sepharose	24
E) Elektrofokussierung	26
F) Gelfiltration über Sephacryl S 200	31
G) Nachweismethoden für den ITI	32
1. BAPNA-Test	32
2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
3. Elektroimmundiffusion nach Laurell	35
4. Azocasein-Test	37

IV.	ERGEBNISSE	38
	A) Elektrofokussierung	38
	B) ITI-Gewinnung aus Humanserum	39
	1. Chromatographie von Humanserum über DEAE-Servacel SH 23	39
	2. Ammonsulfatfällung	41
	3. Gelfiltration auf Sephadex G 200	41
	4. Ammonsulfatfällung - Rechromatographie auf DEAE SH 23	42
	5. Affinitätschromatographie an Con-A-Sepharose	44
	C) Molgewichtsbestimmung auf Sephacryl S 200	48
V.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	54
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	57
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	58

1. EINLEITUNG

Erste Beobachtungen über die antitryptische Aktivität des Serums wurden 1894 von Fermi und Pernossi (19) gemacht. Erste Trennungsversuche für Inhibitoren begann Landsteiner (57), der 1900 die antitryptische Aktivität durch Aussalzungsvorgänge in der Albuminfraction vermutete. Aber die verwendeten Methoden brachten teilweise veränderte Inhibitoren, die nicht exakt charakterisiert werden konnten und daher auch nicht rückblickend in Beziehung zu den heute bekannten Inhibitoren gesetzt werden können.

Erst nach Einführung der Elektrophorese wurden genauere Untersuchungen möglich, wenn auch anfangs Smith und Lindsay 1939 (75) schon unter Verwendung des neuen Verfahrens den Hauptanteil der antitryptischen Aktivität im Serum noch in der Albuminfraction lokalisierten. Mehr als zehn Jahre später fand Shulman (74) zwei Inhibitoren im Serum, die Jakobsson (48) 1953 trennen konnte. 1955 berichtete Jakobsson (49), daß 90 % der antitryptischen Aktivität in der Alpha_1 -Globulin-Zone und 10% in der Alpha_2 -Globulin-Zone zu finden seien.

Die verstärkte Forschungsarbeit der folgenden Jahre mit dem Ziel der Isolierung und Charakterisierung der Proteinaseinhibitoren führte oft mehrere Wissenschaftler unabhängig voneinander zu den gleichen Ergebnissen. Manchmal ging die chemische Charakterisierung der Erkennung einer Inhibitorfunktion um Jahre voraus.

Die heute bekannten Proteinaseinhibitoren im Serum sind Alpha_1 -Antitrypsin, Alpha_2 -Makroglobulin, Alpha_1 -Chymotrypsin, der Inter- Alpha -Trypsininhibitor (=ITI), Antithrombin III und der C_1 -Inaktivator.

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war, ein reines ITI-Präparat zu gewinnen, um für folgende Untersuchungen auf dem Gebiet des ITI ein immer wieder in gleicher Qualität reproduzierbares Antiserum herstellen zu können, da die käuflichen Antiseren diese Eigenschaft zur Zeit noch nicht aufweisen. Außerdem werden die beim Abbau des ITI entstehenden Bruchstücke nach Größe, Hemmkapazität und elektrophoretischer Beweglichkeit charakterisiert.

II. THEORETISCHER TEIL

A) Proteine und Proteasen

Jedes der wahrscheinlich weit über 100 menschlichen Plasmaproteine hat eine spezifische Funktion. So gibt es Abwehrproteine in Form der Immunglobuline, Proteohormone, z.B. Insulin und Parathormon, Transportproteine wie Transferrin und Albumin sowie die Enzyme, die meist im inaktiven Zustand vorliegen und erst nach Interaktion mit einem oder mehreren Plasmafaktoren biokatalysatorisch wirken können.

Die Plasmaspiegel vieler Proteine werden durch beständigen Auf- und Abbau konstant gehalten bzw. an die jeweilige Bedarfssituation des Organismus angepaßt. Beim Abbau katalysieren die Proteasen die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen. Aufgrund ihres Eingreifens in die Peptidbindung werden sie unter die CN-Hydrolasen eingereiht. Nach der Lage des Angriffsortes am Protein unterscheidet man zwei Typen: Endopeptidasen, auch Proteinasen genannt, spalten spezifische Bindungen innerhalb einer Peptidkette; Exopeptidasen oder Peptidasen trennen Aminosäuren an den Enden einer Peptidkette ab. Die Exopeptidasen wiederum werden unterteilt in Carboxypeptidasen, die am Carboxylende wirken, und in Aminopeptidasen, die am Aminoende angreifen.

B) Proteinaseinhibitoren

Zum Zwecke der zeitlichen und räumlichen Anpassung können die Proteinasen sowohl am Kaskadensystem ihrer Aktivierung reguliert als auch durch Plasmaproteine gebunden und neutralisiert werden. Letztere Proteinase-Antagonisten werden Proteinaseinhibitoren genannt. Die frühere Bezeichnung "Antienzym ist falsch, da diese Proteine nicht aufgrund einer vorangegangenen Immunisierung entstehen, sondern nach einem speziesabhängigen Code angelegt werden.

Die Proteinaseinhibitoren sind entweder hochmolekulare Proteine oder relativ niedermolekulare Polypeptide oder auch Glykoproteine und sind in pflanzlichen und tierischen Geweben, im Blutserum und in Sekreten nachweisbar. Die niedermolekularen Inhibitoren sind im Gegensatz zu den hochmolekularen säure- und thermostabil.

Eine Zuordnung von Proteinaseinhibitoren zu zwei Familien ist aufgrund ihrer Struktur möglich. Man spricht vom Kunitz- und Kazaltyp. Es handelt sich hierbei um Sequenzen von jeweils 60 Aminosäuren, die durch Disulfidbrücken eine charakteristische räumliche Struktur erhalten. Prototypen dieser sind der erstmals von Kunitz und Northrop im Jahre 1936 von Rindern gewonnene Pankreasinhibitor (55) (=Trasylol^R) und der 1948 von Kazal (53) entdeckte Sojabohnentrypsininhibitor. Inhibitoren vom Kazal-Typ zeichnen sich meist durch ein polyvalentes Hemmspektrum aus. Sie kommen in pflanzlichen und tierischen Organismen vor. Kunitz-Typ-Hemmstoffe wirken spezifischer, sie kommen nur bei Tieren und beim Menschen vor. Schließlich unterscheidet man je nach dem Aminosäurerest, der im aktiven Zentrum für die Hemmwirkung verantwortlich ist, zwischen Lysin- und Arginininhibitoren. Während Arginininhibitoren durch Acylierung keinen Aktivitätsverlust erfahren, werden die Lysininhibitoren (durch Acylierung der Epsilon-Aminogruppen) inaktiviert.

C) Hemm-Mechanismen bei Proteinaseinhibitoren

Finkenstadt und Laskowski (22/23) vergleichen den Hemmmechanismus einer Enzym-Substrat-Reaktion. Tatsächlich geht die Protease mit dem Inhibitor - ähnlich wie bei der Proteolyse mit dem Protein - eine Komplexbindung ein. Nach der Spaltung der Inhibitor-Peptidkette im aktiven Zentrum trennen sich jedoch im Gegensatz zur Enzym-Substrat-Reaktion Protease und Inhibitor nicht, sondern es bildet sich eine kovalente Bindung zwischen den beiden Partnern aus. Hierbei wer-

den die aktiven Zentren des Enzymmoleküls abgedeckt und somit steht die Protease zur Bindung und Spaltung von Proteinen nicht mehr zur Verfügung. Bei der eben beschriebenen Interaktion spricht man auch von einer "limitierten Proteolyse" des Inhibitors.

In anderen Fällen bleibt die limitierte Proteolyse aus, hier beruht die Hemmung auf Bindungskräften zwischen den Partnern (53).

D) Proteinaseinhibitoren des menschlichen Serums

Sechs Proteinaseinhibitoren sind bisher im Menschenplasma bekannt und untersucht. Ihre Namen erhielten sie entsprechend ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit und ihrer entweder zuerst entdeckten oder wichtigsten physiologischen Funktion, soweit diese zur Zeit der Isolation schon bekannt war. Im Hinblick auf Konzentration im Plasma und Spezifität sind Alpha_1 -Antitrypsin und Alpha_2 -Makroglobulin die wichtigsten. Die anderen, nämlich Alpha_1 -Chymotrypsin, Inter- Alpha -Trypsininhibitor, Antithrombin III und C_1 -Inaktivator sind in geringeren Mengen vorhanden.

Inhibitor	mg/100ml	MW	μMol	Eiweiß- gehalt	Carbohydrat- gehalt (%)
Alpha_1 -Antitrypsin	290,0	54000	54,0	86%	12,2
Alpha_1 -Antichymotrypsin	48,7	69000	7,0	73%	24,6
Inter- Alpha -Trypsininh.	50,0	160000	3,1	90%	8,4
Antithrombin III	29,0	65000	4,5	85%	13,4
C_1 -Inaktivator	23,5	104000	2,3	65%	34,7
Alpha_2 -Makroglobulin	260,0	820000	3,3	92%	7,7

Tabelle 1: Konzentrationen und Charakterisierung der Inhibitoren im menschlichen Plasma (34).

Alle Proteinaseinhibitoren menschlichen Plasmas sind Glyko-

proteine (34). Der Kohlenhydratanteil ist nach gegenwärtiger Kenntnis für die Inhibitorfunktion nicht nötig, wahrscheinlich jedoch für den aktiven Transport durch die Zellmembran bedeutsam.

Die Wirkungsspektren der Proteinaseinhibitoren erstrecken sich auf physiologische Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin, Thrombin und Kallikrein, auf Proteinasen aus zerfallenden Leukozyten, Bakterien und Pilzen, auf Blutgerinnung, Fibrinolyse, Kininfreisetzung und Komplementbildung.

Alpha₁-Antitrypsin:

macht etwa 90% der trypsinhemmenden Kapazität des menschlichen Serums aus (15/49). Es hemmt Trypsin, Chymotrypsin und außerdem die mit der Alpha- und Beta-Globulinfraktion wandernde Aktivität der Leukozyten sowie akrosomale, Bakterien- und Pilzproteinasen.

Besonders bei malignen Erkrankungen, nach großen chirurgischen Eingriffen und bei Myokardinfarkt (in geringerem Umfang nach entzündlichen Reaktionen) erkennt man einen erheblichen Alpha₁-Antitrypsin-Anstieg, einen Abfall als Frühreaktion bei der Transplantat-Abstoßung (49). Linear anwachsende Werte von Alpha₁-Antitrypsin auf doppelte Konzentrationen bis zur Geburt wurden während der Schwangerschaft beobachtet (26).

Von Eriksson und Laurell (16/59) wurde der Mangel von Alpha₁-Antitrypsin beschrieben. Hierbei handelt es sich um einen rezessiv vererbten Gendefekt, wobei fehlende Proteinase-Schutzwirkung eine gehäuft auftretende emphysematöse Veränderung der Lunge bewirkt.

Alpha₁-Antichymotrypsin:

weist von allen Serumproteinasen die größte Spezifität auf - sie vermag nur Chymotrypsin zu hemmen.

Antithrombin III:

wird teilweise bei der Gerinnung in vivo und in vitro verbraucht. Mittels immunologischer Methoden erkannte man dabei eine Komplexbildung mit Thrombin (33/73). Eine Reduktion von Antithrombin III signalisiert daher einen hyperkoaglen, präthrombotischen Zustand. Eine Abnahme fand man bei disseminierter intravasaler Gerinnung und bei Frauen, die progesteron-östrogenhaltige Pillen einnehmen.

C₁-Inaktivator

ist der einzige Inhibitor des Plasmas, der C₁-Esterase inaktiviert. Seine physiologische Rolle wurde bekannt, als eine ursächliche Verbindung zwischen angioneurotischem Ödem und C₁-Inaktivator bei Fällen von erbtem Mangel dieses Proteins erkannt wurde (14/67).

Alpha₂-Makroglobulin:

hemmt neben Trypsin und Chymotrypsin auch Plasmin in einer starken und augenblicklichen Reaktion und in geringem Maß die Fibrinolyse (2).

Vermehrte Spiegel findet man bei Diabetes mellitus und bei verschiedenen Wachstumsprozessen wie Schwangerschaft, Kindheit (26/27), Regeneration und Tumorstadium (73) sowie bei peripheren Venenstauungen (47), nach chirurgischen Eingriffen und bei nephrotischen Erkrankungen.

Neben der Inhibitorfunktion hat Alpha₂-Makroglobulin noch eine Transportfunktion für die kationische Aspartataminotransferase (12) und für Wachstumshormone (29) und ist als einziges Protein in der Lage, Zink zu binden (64).

E) Der Inter-Alpha-Trypsininhibitor

1961 fanden Steinbuch und Loeb bei der Chromatographie menschlichen Serums auf DEAE-Zellulose ein Alpha_2 -Glykoprotein, das sie Protein π (nach dem Entdeckungsort Paris) nannten (76).

Heimburger und Schwick (32) wiesen die inhibitorische Aktivität eines Proteins der Inter-Alpha-Region gegen Trypsin nach.

Heide und Mitarbeiter reinigten 1965 die aktive Komponente und nannten sie Inter-Alpha-Trypsininhibitor (=ITI) (31). Später wurde die Identität von ITI und Protein π nachgewiesen.

1. Physikalische und chemische Eigenschaften.

Seinen Namen erhielt der ITI aufgrund seiner charakteristischen Inter-Alpha-Stellung in Papier- und Zelluloseazetat-elektrophorese (in Barbitalpuffer pH 8,2 - 8,6). In Polyacrylamid, Acrylamid/Agarose und Stärkegel kommt er dagegen wie ein Posttransferrin zwischen Beta_1C und Beta_1A -Globulin zu liegen. In der Immunelektrophorese stellt sich der ITI durch ein Präzipitat in der Alpha_1 -Gegend dar (31/80). Bei pH 8 ist er mit Ammonsulfat, Perchlorsäure, Rivanol und Trichlor-essigsäure präzipitierbar.

Ursprünglich schätzten Steinbuch und Loeb (76) das Molekulargewicht durch Ultrazentrifugation auf 180000 bis 200000. 1970 gab Heimburger (34) einen Wert von 160000 an, wogegen Steinbuch 1975 (79) bei Versuchen in SDS-Polyacrylamidelektrophorese mit 190000 bis 200000 seinen früheren Wert bestätigte.

Die Sedimentationskonstante des Inhibitors beträgt $s_{20w}^{1\%} = 6,4$; seine $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ bei 280 nm ist 7,1 (31).

Der ITI ist ein Glykoprotein mit einem Anteil von 3,4 % Hexosen, 3,5 % Hexosaminen und 2 % Sialinsäure. Nach Heimburger und Mitarbeitern zeigt der Proteinanteil folgende Zusammensetzung:

Lysin	5,63 %	Glutamins.	11,97 %	Isoleucin	3,91 %
Histidin	2,20 %	Prolin	3,69 %	Leucin	7,40 %
Ammonium	1,44 %	Glyzin	2,90 %	Tyrosin	4,01 %
Arginin	5,18 %	Alanin	3,37 %	Phenylala.	5,00 %
Asparagins.	9,50 %	Halb-Zystin	1,69 %	Tryptophan	1,69 %
Threonin	4,64 %	Valin	5,86 %	Kohlen-	
Serin	4,87 %	Methionin	2,00 %	hydrate	8,40 %

Tabelle 2: Aminosäurezusammensetzung des ITI (nach Heimburger)

Der N-terminale Rest ist Arginin. Atomabsorptionsanalysen erbrachten einen Anteil von 0,6 bis 0,95 Grammatom Zn^{2+} pro MW 190000 (76/80).

2. Stabilität

Der ITI ist eines der wenigen sehr instabilen Plasmaproteine, die schon durch Erhitzen auf 56°C denaturiert werden und aggregieren (78). Das Aggregat sedimentiert bei 19 S in der Ultrazentrifuge und bewegt sich in der Zonenelektrophorese annähernd wie Alpha_2 -Makroglobulin, die Lösung bleibt dabei klar und die Hemmeigenschaften sind praktisch unverändert, während die immunologische Reaktivität verloren geht. Antiseren gegen das erhitzte Protein reagieren jedoch auch mit nativem Protein. Auch nach Aufbewahrung in gefrorenem Zustand bildet sich etwas aggregiertes Material (80).

Roher ITI (nach Chromatographie auf DEAE-Zellulose) erscheint vielleicht bei der Zelluloseazetat- oder Papierelektrophorese und sogar in der Immunelektrophorese homogen, aber eine Siebgelelektrophorese oder analytische Ultrazentrifugation enthüllen die Heterogenität (Komponenten mit 7 S und 4 S), die vermutlich auf Aggregation und Proteolyse beruht. Nativer ITI dissoziiert nämlich leicht in zwei Bruchstücke mit $s_{20w} = 4,4$ und erhaltener Hemmfähigkeit. Jedes dieser Bruchstücke zerfällt spontan in eine inaktive Komponente und ein säurestabiles Polypeptid mit Inhibitoreigenschaft.

Der ITI kann zwei bis drei Wochen bei 4°C in sterilem Milieu aufbewahrt werden. Auch Gefriertrocknung ist möglich, wobei meist kleine molekulare Veränderungen vorkommen, die aber keinen Aktivitätsverlust bedingen (80).

3. Spezifität

Der ITI hemmt hauptsächlich Trypsin - je nach Herkunft hemmt 1 mg Inhibitor 0,15 bis 0,20 mg Trypsin (31) - seine Affinität zum Rindertrypsin ist dabei höher als zum menschlichen. Trypsin I von Figarella (21), das wahrscheinlich identisch mit dem kationischen Trypsin von Mallory und Travis (60) ist, wird weit weniger gehemmt als menschliches Trypsin II (=anionisches Trypsin). Über die Hemmung von Menschen-trypsin durch verschiedene Inhibitoren wurde von Travis (81) und Feeney und Mitarbeitern (18) berichtet.

Chymotrypsin vom Rind wird mehr gehemmt als solches vom Menschen, beide jedoch weniger als das jeweilige Trypsin (9). Auch menschliches Akrosin (25) und Plasmin werden durch ITI gehemmt. Die Affinität zu Papain, Bromelin und Pronase (77) ist sehr gering, eine etwas stärkere Reaktion wurde mit einer Insektenpronase beobachtet, die sich wahrscheinlich aus Cocoonase ableitet (58). Die Derivate des ITI sind mit der spezifischen Fähigkeit zur Neutralisation von elastolytischen Proteinasen der Leukozyten befähigt (38).

Der ITI gehört zu der Klasse von Trypsininhibitoren, die ein Arginin in ihrem aktiven Zentrum haben. Durch Veränderung der Guanidinogruppe mit Butanedione wird die Aktivität zerstört (24). Bereits 30% Veränderung der Arginine bringt die Aktivität ebenso wie die immunologische Aktivität zum Verschwinden. Acetylierung und Succinierung der Lysine dagegen haben keine Auswirkung.

4. Kinetische Eigenschaften

Die stabilsten Komplexe bildet der ITI mit Rindertrypsin ($K_i = 21 \text{ pM}$) in einer stöchiometrischen Reaktion. Mit menschlichem kationischen Trypsin ergibt sich ein Komplex mit $K_i = 9 \text{ nM}$ (9). Komplexe mit Chymotrypsin sind weniger fest. Bei Anwesenheit von Alpha₂-Makroglobulin dissoziiert Trypsin sofort vom ITI, um einen festeren Komplex mit Alpha₂-Makroglobulin zu bilden (9). Der Komplex mit dieser Antiprotease hat Esteraseaktivität, der ITI-Komplex nicht.

5. Verteilung

Der ITI ist im normalen Plasma mit 300-500 mg/l enthalten (35). Im Zervicalsehlim ist er zusammen mit anderen Inhibitoren vorhanden, wobei die Mengen in der nicht fruchtbaren Phase des Ovarialzyklus höher sind. Dort erschweren Akrosininhibitoren wie der ITI die Spermienpenetration durch den Zervixschleim (71/25). Auch alle Schleimhäute des Respirationstraktes sowie die Pankreasgänge und andere Speicheldrüsen werden durch abgegebene Inhibitoren gegen Proteinasen geschützt (36).

6. Phylogenese

Mithilfe immunologischer Methoden wurde die molekulare Evolution von Proteinen erforscht. Bauer (5/6/7/8) zeigte, daß der menschliche ITI vollständige immunologische Identität mit dem ITI von Gorilla Gorilla und Pantroglodytes und Teilidentität mit dem ITI von Pongo Pygmaeus besitzt.

7. Reinigungsverfahren

Vorausgestellt soll werden, daß infolge der physico-chemischen Ähnlichkeit vieler Plasmaproteine mit den Inhibitoren die Ausbeute aller gegenwärtig bekannten präparativen Verfahren relativ gering ist.

Steinbuch und Loeb fanden das Protein π bei Chromato-

graphie von Plasma bei pH 5 auf DEAE-Zellulose.

Heide (31) empfiehlt Rivanol- und Ammonsulfatfällung, Zonen-
elektrophorese und Säulenchromatographie an Sephadex G 200.

Nach Heimbürger (30/34) wird frisch recalcifiziertes Serum
an DE-32 adsorbiert, während der Puffergradientenelution
erhält man den ITI in einer Fraktion getrennt von C_1 -Inak-
tivator und kann ihn dann durch Ammonsulfatfällung und Gel-
filtration an Sephadex G 150 weitgehend reinigen.

Steinbuch (79/80) führt anschließend an eine Batch-Adsorp-
tion von Fraktion III oder ACD-Plasma an DEAE-Zellulose eine
Säulenchromatographie durch. Nach Äthanol-fällung und Gel-
filtration an Sephadex G 150 liegt der ITI in weitgehend
reiner Form vor.

8. Beziehung zu anderen Inhibitoren

Im Urin gibt es einen säurestabilen niedermolekularen Tryp-
sininhibitor, reich an Sialinsäure und charakterisiert durch
einen isoelektrischen Punkt von 2,5 und ein Molekularge-
wicht von etwa 16000. Dieses Protein wurde von Astrup be-
schrieben und Mingin genannt (3), nach Trennung von der
Sialinsäure bezeichnete es Astrup als "Miningin" (4). Die
immunologische Beziehung dieses Urin-Trypsin-Inhibitors zum
ITI wiesen Orochs und Nordschow (63) nach.

Bei der Suche nach der Biogenese der ITI-"Derivate" fand
die Gruppe um Hochstraßer zwei Inhibitoren im Überstand
eines durch Perchlorsäurebehandlung von Proteinen gereinig-
ten Plasmas (40). Beide konnten nach Adsorption an Trypsin-
harz getrennt werden. Die Molekulargewichte dieser Proteine,
deren immunologische Beziehung zum ITI sich herausstellte,
betrugen 22000 und 44000. Diese Molekulargewichte und
Aminosäureanalysen ließen den Schluß zu, es könnte sich um
monomere und dimere Formen handeln.

1975 fanden Hochstraßer und Mitarbeiter die Zusammenhänge
zwischen ITI und den säurestabilen Proteinaseinhibitoren des
menschlichen Plasmas und Urins (36): Der humorale ITI ist

der Vorläufer der säurestabilen Proteinaseinhibitoren im menschlichen Serum und Urin, welche physiologischerweise - und bei pathologischen Zuständen vermehrt - intravasal aus dem säurelabilen Vorläufer freigesetzt werden. Dieser säurestabile Inhibitor hat ein scheinbares Molekulargewicht von 65000 und - bei Betrachtung der spezifischen Aktivität - ein tatsächliches von 30000 (daher sein Name: I-30) und wird unverändert in einer Menge von 8000 bis 22000 mU/Tag in den Urin sezerniert (42).

Bei der in vitro- und in vivo-Freisetzung von I-30 aus ITI fallen gleichzeitig mindestens zwei säurelabile Abbauprodukte an, die - wenn auch nur schwach - eine immunologische Kreuzreaktion mit ITI-Antiserum aufweisen. Sie sind in der zweidimensionalen Immunelektrophorese nachweisbar. Das größere der Derivate wird von Hochstraßer (unveröffentlicht) durch ein Molekulargewicht von 100000 charakterisiert. Im Gegensatz zu den säurestabilen Inhibitoren wird es nicht glomerulär filtriert.

Diese Tatsache ist der Grund dafür, daß man durch Bestimmung der säurelabilen Abbauprodukte auch dann noch auf einen erhöhten ITI-turnover schließen kann, wenn die Messung von ITI und Säurestabilen im Plasma Normalwerte vortäuschen. Dies wäre beispielsweise der Fall, wenn bei vermehrter Synthese von ITI und gleichzeitig gesteigertem Abbau auch eine ansteigende Elimination der Säurestabilen stattfindet. Diese Befunde kommen beispielsweise bei Bronchitikern und Sepsis vor.

Der physiologische I-30 wird durch limitierte Proteolyse (s.S. 5) aus dem ITI (als "big inhibitor" klassifiziert) freigesetzt (46). Das freisetzende Enzym ist eine Proteinase, die weder vom "big inhibitor" noch von den freigesetzten Produkten gehemmt wird. Kallikrein erfüllt diese Bedingungen und setzt auch in vitro einen vom I-30 nicht unterscheidbaren Inhibitor frei (13). Auch Elastase aus PMN-Leukozyten wird als physiologisches "inhibitor liberating enzyme" diskutiert (Hochstraßer, unveröffentlicht).

Durch Einwirkung von Trypsin auf intakten ITI oder physiologischen I-30 wird ein säurestabiler Inhibitor mit MW 14000 (= I-14, scheinbares MW 22000) und immunologischer Kreuzreaktivität mit dem Vorläufer freigesetzt. Wahrscheinlich erfolgt bei diesem Abbau des ITI oder I-30 durch Trypsin zunächst die Bildung eines Komplexes zwischen ITI und Trypsin. Dann "verdaut" überschüssiges Trypsin den Teil des ITI, der nicht die Inhibitoraktivität trägt. Da I-30 und I-14 immunologische Kreuzreaktivität zeigen, kann man annehmen, daß das anti-tryptische Zentrum in einem relativ kleinen und sehr stabilen Areal lokalisiert ist, das sowohl der Enteiweißung als auch dem Trypsinüberschuß widersteht.

Aminosäure-Sequenzuntersuchungen zeigten, daß offensichtlich das I-14-Molekül aus zwei homologen Kunitztypdomänen zusammengesetzt ist, wobei eines hemmaktiv ist und das andere infolge einer Mutation an der aktiven Stelle inaktiv ist (13).

Der Vergleich mit dem entsprechenden Inhibitor des Rindes ergab weitgehende Übereinstimmung, das aktive Zentrum des menschlichen I-14 ist jedoch von dem bekannten Kunitztyp-Inhibitor des Rindes (=Trasylol^R) verschieden. Hieraus schlußfolgerten Hochstraßer und Wachter 1977, daß das Gen für die Synthese von Kunitztyp-Inhibitoren bei höheren Organismen in mehreren Varianten vorkommt.

Die Freisetzung von I-30 und I-14 aus ITI ist mit einer Erweiterung der Inhibitorspektren verbunden: Während der ITI ein monospezifischer Trypsininhibitor mit $K_i = 2,1 \times 10^{-11}$ M für Rindertrypsin ist, zeigt der I-30 Aktivität gegen Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin mit K_i Trypsin = $1,4 \times 10^{-11}$ M und K_i Chymotrypsin = $16,7 \times 10^{-10}$ M. Ohne große Abnahme der Aktivität gegen die Enzyme kann I-30 in I-14 umgewandelt werden (K_i Trypsin = $9,4 \times 10^{-10}$ M; K_i Chymotrypsin = $1,2 \times 10^{-10}$ M).

9. Physiologie

Nach Bodman stehen Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitorspiegel unter direkter hormoneller Kontrolle (11). Bei Versuchen an Maus und Ratte zeigten Stansley und Geiringer (28), daß der Inhibitorspiegel von der Geburt bis zur Geschlechtsreife signifikant ansteigt. Nach Ram und Mitarbeiter (65) ist bei der männlichen Maus der Inhibitorgehalt doppelt so hoch wie bei der weiblichen. Ein Abfall nach Kastration kann durch Testosterongabe wieder ausgeglichen werden. Applikation von Testosteron, Cortison, Hydrocortison und Prednisolon erhöhen den Spiegel beim Weibchen. Eine Beeinflussung des Inhibitorspiegels der Ratte durch Nebennierenrindenhormone beobachteten Blatt, Schaefer und Jensen (10/69). Der parallele Verlauf der Ausscheidung von Urin-Trypsininhibitor und der 17-Ketosteroide läßt auf eine Regulation des Inhibitorstoffwechsels durch das Hypophysen-Nebennierensystem schließen (17). Der Gleichgewichtszustand von Antiproteinasen und proteolytischen Enzymen ist besonders während Wachstumsprozessen bedeutsam.

10. Pathologie

Bekanntlich gehen viele Krankheitsbilder mit Verschiebungen des Proteingehaltes der elektrophoretischen Serumfraktionen einher. Serum-Trypsin-Inhibitormessungen bei verschiedenen pathologischen Zuständen wurden vor allem von Schön und Mitarbeitern (70) und von Kemp und Mitarbeitern (54) ausgeführt.

Die biologische Rolle der Plasmainhibitoren wird nicht nur durch ihre Affinität zu gewissen Proteinasen und die molekulare Konzentration im Plasma bestimmt, sondern auch durch deren Fähigkeit, in den extravasculären Raum zu diffundieren und in gewissen biologischen Flüssigkeiten angereichert zu werden. Unter pathologischen Bedingungen wird der Austritt der Plasma-Inhibitoren in den extravaskulären Raum durch mehrere Faktoren beeinflusst.

Verschiedene proteolytische Enzyme wurden in Leukozyten gefunden wie Trypsin-Elastase und Kollagenase-ähnliche Enzyme (50/51/52/62). Die große Anzahl proteolytischer Enzyme in polymorphkernigen Leukozyten wird gebraucht, um infektiöse Herde zu räumen. Diese notwendige Aktivität wird jedoch kritisch, wenn das elastaseähnliche Enzym arterielle elastische Fasern und Gefäßbasalmembranen angreift wie bei der akuten Arthritis (50/51). Granulozytenkollagenase ist für den Kollagenzusammenbruch verantwortlich, der mit akuter Entzündung verbunden ist (51). So werden PMN-Proteinasen, die Schutzfaktoren gegen infektiöse Agentien darstellen, selbst verletzend: Agentien, indem sie Gewebe verdauen. Antiproteolytische Aktivität ist dann nötig, um den autodestruktiven Vorgang zu stoppen. Neben Alpha_1 -Antitrypsin sind hier der ITI und dessen Derivate mit niedrigerem Molekulargewicht in Urin und Pleuraflüssigkeit wirksame Inhibitoren einiger PMN-Proteinasen.

Bei allen Arten von Nephropathien findet man wachsende Serumspiegel des Urin-Trypsininhibitors durch mangelhafte Sekretion in den Urin (45). Manchmal steigt der Serumspiegel bis zum 20-fachen der Norm an (41). Die Bestimmung der

Konzentration dieses Inhibitors im Serum bietet einen interessanten diagnostischen Parameter in der Nephrologie (20/44/45), beispielsweise ist es möglich, den funktionellen Zustand eines Nierentransplantates während der Hämodialyse zu beobachten und eine Prognose aufgrund von Veränderungen des Inhibitorspiegels im Serum bereits 24-48 Stunden vor einer manifesten Einschränkung der Kreatinin-Clearance abzugeben. Nephropathien werden durch Erhöhung säurestabiler niedermolekularer Inhibitoren im Serum (42) früher angezeigt als durch Veränderungen des Kreatininspiegels.

Bei erwachsenen Bronchitikern ist kein Serum-ITI-Mangel infolge von erhöhtem Bronchialschleiminhibitor festgestellt worden. Bei Früh- und Neugeborenen mit Atemnotsyndrom und entzündlichen Erkrankungen sind aber Inhibitogen-(=ITI)-Mangelzustände sehr häufig (43). Die Inhibitogenproduktion ist im frühen Kindesalter offensichtlich noch nicht voll ausgeprägt, so daß bei erhöhtem Inhibitorverbrauch oder exzessiver Kalikreinfreisetzung ein Inhibitogenmangelzustand resultiert. Solche Mangelzustände können durchaus auch bei Erwachsenen auftreten, in diesen Fällen sind jedoch schwere Entzündungen verschiedener Ursache auslösende Faktoren. Bei Bronchialaffektionen ist als Ergebnis der gesteigerten Produktion von Leukozytenproteinasen das Verhältnis von freien zu leukozytenproteinasengebundenen Schleiminhibitoren von 3:1 bei Normalpersonen auf bis zu 1:3 verändert.

III. ANGEWANDTE METHODEN

A) Ionenaustauschchromatographie auf DEAE SH 23

1. Allgemeines

Bei der Ionenaustauschchromatographie ist eine reversible Adsorption aufgrund von Ionenbeziehungen als Trennprinzip wirksam. Die Austauscher bestehen aus einer unlöslichen Matrix (beispielsweise Kunstharz oder ein Polysaccharid), die chemisch gebundene geladene Gruppen besitzt, und aus frei beweglichen Gegenionen, die gegen andere Ionen gleicher Polarität austauschbar sind. Je nach Ladung der freien Ionen unterscheidet man Kationen- und Anionenaustauscher. Art und Anzahl der gebundenen Gruppen sind charakteristische Parameter der Austauscher.

Die Trennung der Substanzen erfolgt in zwei Schritten: zunächst werden die Stoffe an den Austauscher gebunden, dann dadurch getrennt, daß die Komponenten je nach ihren elektrischen Eigenschaften nacheinander einzeln abgelöst werden. Zum Ablösen wird die Salzkonzentration oder der pH-Wert des Trennmediums (=Elutionspuffer) kontinuierlich verändert, wodurch für jede einzelne gebundene Substanz die Bindungsstärke an den Ionenaustauscher ständig vermindert wird, bis keine Interaktion mehr mit dem Austauscher erfolgt und die Substanz eluiert wird. Die Trennschärfe ist umso größer, je weniger steil der Ionenstärkegradient der Elution gewählt wird und je langsamer die Durchflußgeschwindigkeit ist.

2. DEAE-Ionenaustauscher

Die Matrix der DEAE-Ionenaustauscher ist ein natürlich vorkommendes Polysaccharid aus Beta(1-4)-verbundenen Glukoseeinheiten. Dieses Polysaccharid wird aus Holzfasern gewonnen, zunächst mikrokristallin gereinigt und dann zu einer kugelförmigen gelartigen Struktur regeneriert, wobei der

feuchte Kugeldurchmesser 40 - 160 μm beträgt. Wichtigste strukturformende Bindungen sind Wasserstoffbrückenbindungen und Quervernetzung mit Epichlorohydrin.

Die funktionellen Gruppen sind durch Ätherbindungen direkt an die C-Atome 2, 3 und 6 der Glukoseeinheiten angeknüpft. Es sind Diäthylaminogruppen der Struktur $-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$. Gegenionen dazu sind Chloridionen.

Der verwendete Geltyp Servacel SH 23 eignet sich besonders zur Trennung von neutralen und sauren Proteinen.

3. Experimentelle Durchführung

a) Vorbereitung: Packen, Äquilibrieren, Prüfen.

Die 50 $\varnothing$ x 500 mm große Säule wird vertikal montiert und der Totraum unter dem Filtersystem und der Auslaufschlauch blasenfrei mit Startpuffer gefüllt. Verwendet wird ein 0,5M TRAPuffer pH 8,6, der zur Konservierung (Schutz vor mikrobiellem Wachstum) 0,02 % Natriumazid und zum Schutz gegen die Entfaltung proteolytischer Aktivität in der Säule 10^{-4} M Benzamidin enthält.

Der äquilibrierte Ionenaustauscher wird mit Startpuffer soweit verdünnt, daß Luftblasen leicht aufsteigen können. Sodann wird die Ionenaustauscher-Suspension an der Säulenwand oder einem Glasstab entlang vorsichtig in die Säule gegossen. Ein aufgesetztes Gelreservoir gestattet die Füllung in einem Zuge. Die Entwicklung von Luftblasen ist zu vermeiden.

Die Säule wird bis oben hin mit Puffer gefüllt und nach Aufsetzen eines Zulaufs (luftblasenfrei, da sonst das Eluant tropfenweise in die Gelsuspension fällt und so das gleichmäßige Absetzen der Gelteile stören würde) über eine Peristaltikpumpe mit einem Eluantreservoir verbunden. Nun wird der Säulenauslauf geöffnet und die Säulenfüllung unter konstantem Druck gepackt.

Zur Stabilisierung und Äquilibrierung sollten zwei bis drei

Säulenvolumina an Startpuffer durch die Säule laufen. Die Flußgeschwindigkeit sollte der in den nachfolgenden Experimenten entsprechen. Das Austauscherbett ist völlig äquilibriert, wenn der pH der Flüssigkeit im Auslauf mit dem Startpuffer übereinstimmt. Die Prüfung der Säule geschieht am einfachsten im Gegenlicht. Heterogenitäten und Luftblasen werden so leicht erkannt.

b) Auftragen der Probe.

Das Volumen der aufzutragenden Probe sollte 10 % des Austauschervolumens nicht überschreiten, es sei denn, alle interessierenden Substanzen werden unter Startbedingungen adsorbiert. Dies trifft bei der beabsichtigten ITI-Gewinnung zu. Als Ausgangsmaterial werden Seren von Patienten der Rheumatikerabteilung der Universitätspoliklinik München verwendet, die in eingefrorenem Zustand aufbewahrt wurden. Da die Zusammensetzung der Probe der des Startpuffers entsprechen sollte, werden zwei Liter aufgetautes Serum mit zwei Litern Startpuffer gemischt und auf einen pH von 8,6 eingestellt.

Das Eluant über der Geloberfläche wird zum größten Teil abgesaugt, den Rest läßt man ablaufen. Nach Verschuß des Auslaufhahnes wird ein Teil der Probe vorsichtig auf die Säule aufgetragen, ein Zulauf luftblasenfrei aufgesetzt und über eine Peristaltikpumpe mit dem Rest der Probe verbunden. Anschließend wird die Probe mit etwa 220 ml/h auf die Säule gepumpt.

Sobald alles durchgelaufen ist, werden die Geloberfläche und die Säulenwand, die mit der Probe in Berührung war, mit wenig Puffer gewaschen. Unter keinen Umständen sollte dabei die Säule trocken laufen!

Nach dem Aufbringen der Probe wird die Säule mit Startpuffer aufgefüllt und noch einmal mit Startpuffer durchgewaschen.

c) Elution

Der Eingang der Peristaltikpumpe (220 ml/h) am oberen Pol

der Säule wird mit einem LKB-Gradientenmischer verbunden, der innerhalb von 64 Stunden mittels eines linearen Gradienten den NaCl-Gehalt des Elutionspuffers kontinuierlich von 0 bis 0,4 M steigert. Der Säulenauslauf wird mit einem Fraktionssammler, der das Eluat auf 10 Fraktionen/Stunde verteilt, verbunden.

Zur groben Orientierung über die Elution von Proteinen dient die kontinuierliche Messung der Absorbanz des Eluates und die Registrierung des "Elutionsprofiles" auf einem Uvicord-Schreiber bei 253 nm.

Die Chromatographie wird unter Kühllhaltung durchgeführt, um physikalisch-chemischer oder biochemischer Umwandlung der Proteine entgegenzuwirken. Auch Konvektionsströme lassen sich durch Temperaturen nahe 4°C wirkungsvoll vermindern, da wäßrige Lösungen hier nur geringen Dichteänderungen unterliegen. Zudem wird die Sorption durch niedrigere Temperaturen verbessert.

B) Ammonsulfatfällung

1. Allgemeines

Bei der Salzfällung von Proteinen wird die Tatsache ausgenutzt, daß verschiedene Proteine bei verschiedenen Salzkonzentrationen ausfallen. Die wichtigsten Variablen für die Löslichkeit von Proteinen sind pH, Temperatur und die Art des verwendeten Elektrolyts. Die Löslichkeit eines Proteins erniedrigt sich mit zunehmender Annäherung an seinen isoelektrischen Punkt und im allgemeinen mit abnehmender Temperatur. Zum Aussalzen eignen sich vor allem polyvalente Elektrolyte, die aufgrund der "ionic strength" effektiver wirken als univalente Ionen.

Konz. Mol/l	% Sättigung (NH ₄) ₂ SO ₄	Ausgefallene Proteine	% des Gesamt- proteins
1,39	34	Die meisten Gamma-Globuline	20
1,64	40	Gamma-, Beta-, Alpha-Globuline	15
2,05	50	Beta-, Alpha-Globuline, Alpha-Mucoproteine	14
2,57	62	kristallines Albumin	32
2,80	68	Albumin, Hämocuprein, Glyko-proteine, Enzyme	19

Tabelle 3: Ausfällen von Proteinen aus Pferdeserum (Cohn et al., 1940) durch Ammoniumsulfat pH 6,0 bei Zimmertemperatur.

2. Experimentelle Durchführung

Die Fraktionen 41-130 der DEAE-Chromatographie werden zunächst in einer Amicon-Zelle mit PM-10-Membran (diese ist durchlässig für Moleküle bis MW 10000) durch Stickstoffüberdruck auf 200 ml konzentriert.

Unter ständigem Rühren und Eiskühlung wird zum Konzentrat Ammoniumsulfat schrittweise bis zur Endkonzentration innerhalb von 30 Minuten hinzugegeben. Dann wird noch 60 Minuten weitergerührt. Die ausgefallenen Proteine werden in einer Kühl-Ultrazentrifuge 30 Minuten bei 18000 Umdrehungen abzentrifugiert.

Versuche zur Ammonsulfatfällung mit verschiedenen Salzkonzentrationen haben ergeben, daß zur Darstellung des ITI eine bis 2,0 M ansteigende Salzkonzentration am günstigsten ist.

Das Sediment wird in insgesamt 80 ml 0,05 M Natriumazetatpuffer pH 6,0 aufgenommen, der noch 0,1 M NaCl, 0,02 % Natriumazid und 10⁻⁴ M Benzamidin enthält, und gleich auf Sephadex G 200 aufgebracht.

C) Gelfiltration auf Sephadex G 200

1. Prinzip

Trennprinzip bei der Gelfiltration ist die Molekülgröße. Moleküle, die größer sind als die größten Poren der Gelmoleküle, können nicht in diese eindringen. Deshalb durchlaufen diese Teile das Molekülsieb in der flüssigen Phase außerhalb der Partikel. So werden sie zuerst eluiert. Kleinere Moleküle jedoch durchwandern die Gelpartikel in verschiedenem Ausmaß abhängig von ihrer Größe und ihrer Gestalt. Also werden Stoffgemische von Sephadex-Molekülsieben in der Reihe sinkender Molekulargröße eluiert.

2. Durchführung der Gelfiltration

Sephadex ist ein Dextran-Gel in Kugelform. Es gibt verschiedene Typen, die sich in ihren Fraktionierungsbereichen unterscheiden. Charakterisiert werden die Gele durch das K_{av} -Molekulargewicht-Diagramm, wobei K_{av} bedeutet:

$$K_{av} = \frac{\text{Elutionsvolumen} - \text{Totvolumen}}{\text{Volumen der stationären Phase}}$$

Totvolumen = Raum zwischen den Gelkörnern

Volumen der stationären Phase = Gelkornvolumen

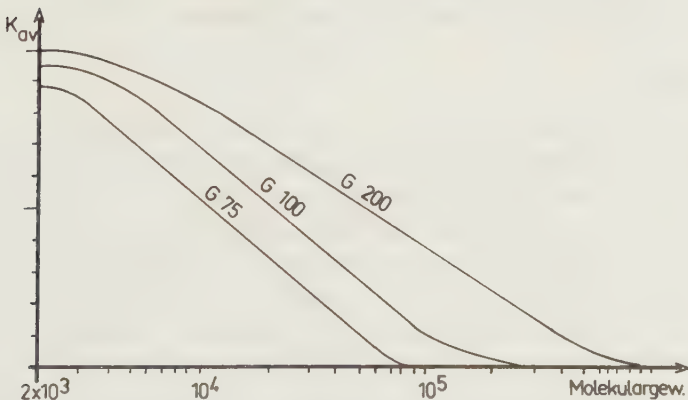


Abbildung 1: Beziehung zwischen Elutionsverhalten und molekularen Eigenschaften (Nach Dr.P. Andrews)

Das Gel sollte so gewählt werden, daß die Trennung in den linearen Teil des K_{av} -MW-Diagramms fällt. Bei einem MW von etwa 200000 für den ITI bietet sich als G 200 an. Es hat einen Fraktionierungsbereich von 5000 bis 800000 MW für Peptide und Proteine.

Die 50 Ø x 1950 mm große Säule wird nach dem gleichen Verfahren wie bei der Ionenaustauschchromatographie beschrieben hergerichtet. Zum Äquilibrieren dient der Elutionspuffer, der 0,05 M Natriumazetat, 0,1 M NaCl, 0,02 % Natriumazid und 10^{-4} M Benzamidin bei pH 6,0 enthält. Da die Oberfläche des Dextran-Betts sehr leicht durch das Aufbringen der Probe gestört werden kann, wird sie durch Auflegen von Filterpapier, porösem Plastik oder einem Nylonnetz geschützt.

Nach Absaugen des Eluants am oberen Säulenende wird dort die Probe aufgebracht und der Auslaufhahn geöffnet, bis jene vollständig eingedrungen ist. Das obere Säulenende wird mit Puffer aufgefüllt, geschlossen und mit einem Eluantreservoir verbunden. Der Auslaufschlauch wird mit einer Peristaltikpumpe (50 ml/h) verbunden, die einen Fraktionssammler (2 Fraktionen/Stunde) beschickt. Die Extinktion des Eluats wird bei 280 nm durch einen Isco-Schreiber registriert.

D) Affinitätschromatographie an Con-A-Sepharose

1. Prinzip

Affinitätschromatographie ist ein Typ der Adsorptionschromatographie, bei dem die Chromatographiesubstanz zum Stoff, der isoliert werden soll, biologische Affinität hat. Die spezifischen adsorptiven Eigenschaften des Säulenmaterials werden durch kovalente Bindung eines geeigneten Bindungsliganden an eine unlösliche Matrix erhalten. Der gebundene Ligand ist dann in der Lage, aus der Lösung die zu isolierende Substanz zu adsorbieren, später wird die Desorption durch Änderung der experimentellen Bedingungen ausgelöst, nachdem ungebundene

Substanzen ausgewaschen worden sind. Die hohe Spezifität der Trennung ist vergleichbar der natürlichen Spezifität der Antigen-Antikörper- oder Enzym-Inhibitor-Reaktion. Die Affinitätschromatographie liefert Möglichkeiten für die Isolation von Substanzen je nach ihrer biologischen Funktion und unterscheidet sich so stark von herkömmlichen Chromatographietechniken, bei denen die Trennung von groben physikalischen und chemischen Unterschieden zwischen den Substanzen abhängt.

2. Concanavalin-A-Sepharose

Concanavalin-A ist ein Metalloprotein aus Pflanzen, das in Anwesenheit von Mn^{2+} und Ca^{2+} zur Bindung von Alpha-Mannopyranosyl, Alpha-Glucopyranosyl und sterisch ähnlichen Resten befähigt ist. Zur Affinitätschromatographie wird Con-A kovalent an Sepharose 4B im Verhältnis von ca. 8 mg Protein pro 1 ml gequollenes Gel gebunden. Voll bindungsfähig ist Con-A-Sepharose bei Zusatz von 2g Mn^{2+} und 2g Ca^{2+} -Ionen pro Grammolekül Protein.

3. Experimentelles Vorgehen

Als Startpuffer wird wie bei G 200 ein 0,05 M Natriumazetatpuffer mit 0,1 M NaCl, 0,02 % Natriumazid und 180 mg/l Benzamidin verwendet.

Die 16 Ø x 300 mm große Säule wird nach dem bekannten Verfahren gepackt und äquilibriert.

Das lyophilisierte Material aus den Fraktionen 261-360 der zweiten DEAE-Chromatographie, etwa 55 mg, würde die Kapazität der Säule übersteigen, es wird daher halbiert und in zwei aufeinanderfolgenden Läufen verarbeitet: 27 mg werden in ca. 5 ml Elutionspuffer aufgenommen und wie bekannt aufgetragen. Am oberen Säulenende wird das Eluantreservoir angeschlossen, am Auslauf eine Peristaltikpumpe (16 ml/h). Die Registrierung geschieht über einen Isco-Schreiber bei 280 nm. Zunächst werden die nicht gebundenen Substanzen mit Start-

puffer ausgewaschen. Die gebundenen Anteile erscheinen nach Zusatz von 0,05 M Alpha-D-Methylglucosid zum Puffer im Eluat.

E) Elektrofokussierung

1. Allgemeines

Bei der Elektrofokussierung werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt, an dem sie jeweils die Nettoladung Null aufweisen, getrennt. Ist der pH einer Lösung höher als der isoelektrische Punkt eines darin befindlichen Proteins, so weist dieses Protein aufgrund eines Protonenverlustes eine Negativladung auf. Umgekehrt führt Protonenaufnahme in einer Lösung, deren pH niedriger als der isoelektrische Punkt ist, zu Positivladung.

Wird eine Probe von Proteinen zu einer Lösung gegeben, die einen pH-Gradienten besitzt, der den Bereich der isoelektrischen Punkte der Eiweiße abdeckt, nehmen die Proteine eine Ladung an, die durch ihren isoelektrischen Punkt und den pH-Wert des Gradienten an dem Punkt, an dem die Proteine liegen, bedingt ist. Wird nun ein elektrisches Feld angelegt, wandert jedes Protein an den Ort im Gradienten, an dem der pH gleich seinem isoelektrischen Punkt ist. Positiv geladene Proteine wandern in Richtung auf die Kathode, negative zur Anode. Am Punkt, wo der pH gleich dem isoelektrischen Punkt des Proteins ist, weist dieses keine Ladung mehr auf und kommt daher zum Stillstand.

2. Ampholine als Trägermolekül

Ampholine Trägerampholyte (Hersteller: LKB Bromma) werden aus Acrylsäure und einer Mischung von vielen verschiedenen Polyäthylen-Polyaminen in wäßriger Lösung synthetisiert. Nach der Synthese enthält die Mischung ein weites Spektrum aliphatischer polyamino-polycarboxylicher Säuren mit einem weiten

von Proteinzonen während der Elution ist eine Stabilisierung notwendig. Diese erfolgt durch einen Dichtegradienten. Zur Verwendung gelangen Saccharose, Glycerin oder Äthylenglykol.

5. Experimentelles Vorgehen

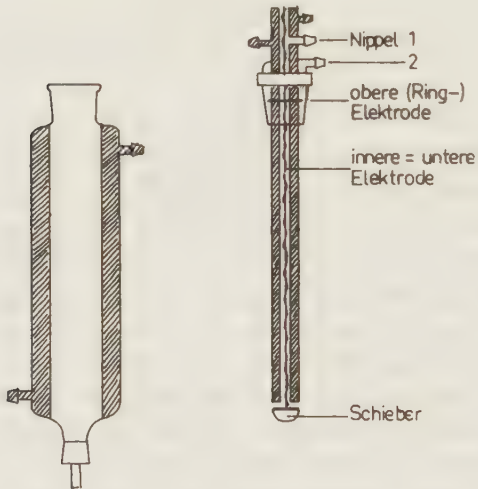


Abbildung 2: Elektrofokussierungssäule der Firma LKB

Die Elektrofokussierungssäule der Firma LKB besteht laut Abbildung 2 aus zwei Teilen. Steckt man diese zusammen, so ist der Aufbau der Säule von innen nach außen folgender: In der innersten Röhre befindet sich die innere = untere Elektrode. Durch den inneren Kühlmantel ist dieser Raum gegen den eigentlichen Elektrofokussierungsbereich abgegrenzt. Außen befindet sich ein weiterer Kühlmantel.

Als Dichtegradientenmischer dienen vier über die Böden miteinander verbundene Plexiglasgefäße gemäß Abbildung 3.

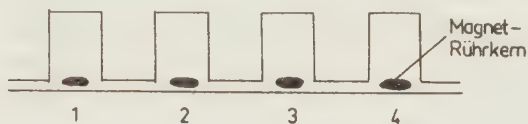


Abbildung 3: Gradientenmischer

a) Herrichten der Säule

Die äußere Säule wird senkrecht an einem Ständer befestigt und die innere Säule in die äußere gesteckt. Dann werden innerer und äußerer Kühlmantel verbunden und an ein Kühlaggregat angeschlossen. Der Durchfluß soll bei $4 - 10^{\circ}\text{C}$ 5 - 10 l/min betragen.

b) Vorbereiten der Lösungen

Elektrodenlösungen für Anode am oberen Ende:

Kathodenlösung: 15 g Saccharose

10 ml H_2O

6 ml 1M NaOH

Gesamt 25 ml

Saccharosekonzentration 60 %

Anodenlösung: 1,5 ml 1M H_3PO_4

8,5 ml H_2O

Gesamt 10,0 ml

Elektrodenlösungen für Kathode am oberen Ende:

Kathodenlösung: 2,5 ml 1M NaOH

7,5 ml H_2O

Gesamt 10,0 ml

Anodenlösung: 15 g Saccharose

12 ml H_2O

4 ml 1M H_3PO_4

Gesamt 25 ml

Saccharosekonzentration 60 %

Gradientenlösungen:

	Dichte Lösung	Leichte Lösung
Saccharose	27 g	2,7 g
H ₂ O + Ampholine + Probe	37 ml	53 ml
Gesamtvolumen	54 ml	54 ml
Saccharosekonzentr.	50 %	5 %

Die Gradientenlösungen werden in die vier Behälter des Gradientenmischers folgendermaßen verteilt:

Behälter 1: 27 ml dichte Lösung

Behälter 2: 18 ml dichte/ 9 ml leichte Lösung

Behälter 3: 9 ml dichte/ 18 ml leichte Lösung

Behälter 4: 27 ml leichte Lösung

Beim Befüllen sind die Verbindungsschläuche zwischen den einzelnen Behältern abzuklemmen, um ein Vermischen der Lösungen zu verhindern.

c) Füllen der Säule

Der Auslaufhahn der Säule wird geschlossen, der Schieber (Abb. 2) geöffnet. Über Nippel 1 wird die dichte Elektrodenlösung blasenfrei zugeführt. Den Ablaufschlauch läßt man vollaufen. An den Auslauf des Gradientenmischers wird eine Peristaltikpumpe (60 ml/h) angeschlossen. Der Auslaufschlauch dieser Pumpe wird so durch Nippel 2 eingeführt, daß die Flüssigkeit aus dem Schlauch die Glaswand entlangfließt, um Turbulenzen zu vermeiden. Nach Einschalten der Rührer am Gradientenmixer und Öffnen der Klemmen kann die Peristaltikpumpe in Betrieb genommen werden.

Hat der Spiegel des Gradienten eine Höhe von etwa 1 cm unterhalb der oberen Elektrode erreicht, so wird der Gradientenmischer vom Eingang der Pumpe abgenommen und die leichte Elektrodenlösung durch die Pumpe auf den Gradienten bis zu einer Höhe von circa 1 cm oberhalb der oberen Elektrode aufgebracht.

d) Elektrofokussierung

Die Spannung am angeschlossenen Netzteil wird so eingestellt, daß die höchste Leistung am Anfang in der Säule 5 Watt beträgt. Wenn Konvektionsströme entstehen, ist die Spannung zu hoch. Nach jeweils zwei Stunden kann die Spannung soweit erhöht werden, daß der Strom um etwa 10 % steigt. Diese Maßnahme dient nur der Verkürzung der Fokussierungszeit.

Während der Fokussierung sinkt der Strom ständig, da immer weniger Molekülbewegungen stattfinden. Wenn die Fokussierung abgeschlossen ist, haben alle Proteinmoleküle ihren isoelektrischen Punkt erreicht, es bleibt ein konstanter Reststrom. Da das Minimum der Stromaufnahme schlecht festzustellen ist, läßt man nach dem vermeintlichen Stromminimum die Fokussierung sicherheitshalber noch etwa 6 Stunden laufen.

e) Entleeren der Säule

Nach Ausschalten des Netzteiles wird der Schieber (Abb. 2) geschlossen und die dichte Elektrodenlösung durch Nippel 1 aus der inneren Säule abgesaugt. Über Nippel 2 wird die leichte Elektrodenlösung ausgepumpt. Die Säule wird nun durch Nippel 2 über die Peristaltikpumpe mit Wasser gefüllt. An Nippel 2 wird ein Reduzierstück gesteckt, das den direkten Anschluß der Pumpe erlaubt. Das Reduzierstück wird blasenfrei mit Wasser gefüllt und der gefüllte Pumpenschlauch wird fest daran angeschlossen.

Der Auslauf der Säule wird geöffnet und die Säule durch Nachpumpen von ca. 60 ml Wasser/Stunde in einen Fraktionsteiler entleert.

F) Gelfiltration über Sephacryl S 200

Sephacryl S 200 ist ein kovalent kreuzverbundenes allyl-Dextran mit N,N'-methylen Bisacrylamid, das ein festes Gel mit einem engen Bereich von Porengrößen ergibt. Es erfreut durch hohe Auflösung bei reduzierter Zonenstreuung und hohe

mechanische und chemische Beständigkeit. Die Ausschlußgrenze liegt bei fast 250000 daltons für globuläre Proteine und fast 80000 daltons für Dextrane. Das K_{av} -Molekulargewicht-Diagramm (s.S.23) zeigt Abbildung 4:

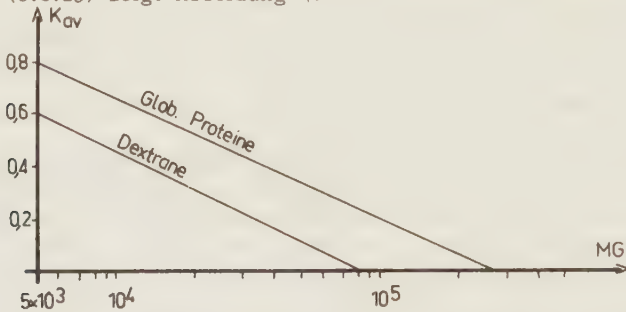


Abbildung 4: K -MW-Diagramm für Sephacryl S 200

Die Durchführung der Gelfiltration über Sephacryl S 200 geschieht wie bei Sephadex G 200.

G) Nachweismethoden für den ITI

1. BAPNA-Test

Allgemeines: Trypsin vermag aus N-Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (=BAPNA) p-Nitroanilin freizusetzen, welches anhand einer Extinktionszunahme bei 405 nm gemessen werden kann. Wird nun unter gleichen Bedingungen eine Trypsininhibitor enthaltende Probe gemessen, so wird ein Teil des Trypsins (oder alles) gehemmt, es wird also nicht so viel p-Nitroanilin freigesetzt, die Extinktionszunahme ist geringer.

Material: Trypsin vom Rind, behandelt mit TPCK
BAPNA, Merck/Darmstadt

Durchführung: In Küvetten wird pipettiert:

	Inhibitoransatz	Vergleichsansatz	Konzentration
Trypsinlösung	0,2 ml	0,2 ml	10 mU/ 0,2 ml 0,0025 N HCl
Puffer TRA 7,8	1,8-x ml	1,8 ml	0,2 M
Probe	x ml, max. 0,5		

Die Ansätze werden gemischt und die Reaktion durch Zugabe von je 1,0 ml BAPNA-Lösung gestartet. Drei Minuten lang wird genau jede Minute die Extinktion der Ansätze bei 405 nm abgelesen. Die Extinktionsänderungen pro Minute werden ausgerechnet und aus jeweils zusammengehörenden Werten das arithmetische Mittel gebildet. Die Extinktionsminderung zwischen Probe und Leerwert ist proportional der Inhibitoraktivität nach folgender Gleichung:

$$\text{Inhibitoraktivität} = \frac{E \text{ Leerwert} - E \text{ Probe}}{0,0066} \quad \text{ImU}$$

Die InhibitorKonzentration der untersuchten Probe ergibt sich durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor. Die Hemmung ist bei fast allen Inhibitoren nicht bis zum 100 % - Wert linear proportional der InhibitorKonzentration. Die Menge der zugesetzten Probe soll daher so gewählt werden, daß 20 - 70 % Hemmung erreicht werden, in diesem Bereich verläuft die Hemmkurve linear.

2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Allgemeines: Gele unterscheiden sich von flüssigen Medien durch hohe Viskosität und hohen Reibungswiderstand. Infolgedessen verhindern solche Medien nicht nur Konvektion und senken die Diffusion auf ein Minimum, sondern sie nehmen auch aktiv am Trennungsprozeß teil, indem sie mit den wandernden Teilchen in Wechselwirkung treten. Diese hängt von der Molekulargröße ab. Infolgedessen werden bei der Gelelektrophorese die Partikel nicht nur nach Ladung, sondern

auch nach Größe getrennt.

Polyacrylamid, ein synthetisches Polymer, ist ein dreidimensionales Polymerisations- und Vernetzungsprodukt von Acrylsäureamid mit einem Vernetzer. Zur Gelelektrophorese ist es besonders geeignet, da es bei Zubereitung aus genügend reinen chemischen Komponenten stets in gleicher Qualität reproduzierbar ist und die Dichte des Gels in einem weiten Bereich (2 - 30 %) variiert werden kann.

Durchführung: Das verwendete 7,5 %ige Mittelporengel pH 8,9 ist für Proteine zwischen 10^4 und 10^6 verwendbar.

Lösung Nummer	Bestandteile/ 100 ml Lösung	pH	Mischungsverhältnis
1	1 N HCl 48,0 ml Tris 36,6 g Temed 0,23 ml	8,9	1 Teil Nr. 1 2 Teile Nr. 2
2	Acrylamid 30,0 g Bis 0,8 g		1 Teil H ₂ O
3	Persulfat 0,14 g		4 Teile Nr. 3
Persulfat = Ammoniumperoxodisulfat Temed = N, N, N', N', Tetramethyläthylendiamin Bis = N, N', Methylenebisacrylamid Persulfat - Temed = Katalysator - Redoxsystem Bis = Vernetzer			

Die fertige Mischung wird in eine Flachgelapparatur (EC Apparatus Corporation, maximal 24 Probenschlitze) ausgegossen. Nach Polymerisation wird das Gerät gedreht, so daß das Flachgel senkrecht steht, und an die Wasserkühlung angeschlossen. Jetzt werden 4 Liter Elektrodenpuffer eingefüllt:

6,0 g Tris / 1000 ml
 28,8 g Glyzin / 1000 ml
 in 10 %iger wäßriger Lösung, pH 8,3

Nun wird der Schlitzrechen entfernt und das Flachgel ist fertig zum Auftragen der Proben.

Je nach Proteingehalt der Probe können pro Schlitztasche maximal 40 μ l aufgegeben werden. Zur Markierung dient der Zusatz von je 5 μ l Saccharose/Bromphenolblau.

Die zu trennenden Substanzen laufen bei der Elektrophorese von Minus (oben) nach Plus (unten). Die angelegte Spannung beträgt 150 Volt. Nach etwa vier Stunden kann die Elektrophorese beendet werden.

Fixierung und Färbung des Flachgels geschieht über Nacht unter Verwendung eines Magnetrührers in Coomassie Brilliant Blue R 1 %ig in Wasser gelöst, filtriert und 1:19 mit Trichloressigsäure verdünnt. Entfärbt wird in 7 %iger Essigsäure.

3. Elektroimmundiffusion nach Laurell

Allgemeines: Ein genaues Volumen Antigen wird in eine Ausstanzung eines Agarosegels uniformer Dicke gegeben, das den korrespondierenden Kaninchen-Antikörper enthält. Ein elektrisches Feld verursacht die Wanderung von Antigen und Antikörper. Sie reagieren miteinander und bilden Präzipitatzonen wie aufsteigende Raketen. Ungebundenes Antigen in der konischen Spitze wandert in die Zone des Antigen-Antikörper-Präzipitats und löst die Komplexe an der Front wieder auf. Die vordere Präzipitatzone wird gegen eine der Elektroden vorgeschoben, und zwar umso langsamer, je mehr freies Antigen verschwindet. Die endgültige Präzipitatzonenspitze jedes Antigens bei gegebener Antikörper-Konzentration in der Agarose variiert mit der Menge zugegebenen Antigens.

Material: Anti-Inter-Alpha-Trypsininhibitor vom Kaninchen, Behringwerke, Marburg;
Agarose, Behringwerke

Gießen der Agaroseplatten: 5 g Agar purum werden zu 250 ml Wasser gegeben und durch Kochen gelöst.

Im Wasserbad bei 56 C werden pro Agaroseplatte 3 ml 2 %ige

Agarose, 3 ml Barbitalpuffer pH 8,6 und 125 μ l ITI-Antiserum in je ein Reagenzglas gegeben und gemischt.

Auf abgeflamnte und genau waagrecht ausgerichtete (Nivelliertisch) Glasplatten der Größe 7 x 7 cm gießt man die Agarose-Antigen-Mischungen - man läßt diese zuvor etwas erkalten - blasenfrei aus.

Nach Verfestigung der Agaroseschicht werden mit Hilfe spezieller Stanzschablonen und Stanzkanülen (durch die bei Anschluß an eine Wasserstrahlpumpe entsprechende Agarosebezirke abgesaugt werden) Auftragstellen in die Gelschicht eingestantzt. Auf eine 7 x 7 cm Platte kommen 12 Auftragstellen.

Auftragen der Proben: Das Auftragen der Proben - ein Stanzloch faßt maximal 14 μ l - geschieht mit einer Hemingway-Pipette. Dabei ist ein Verletzen der Agarschicht durch die Pipettenspitze und Verschleppen von Material durch im Totraum der Spritze zurückbleibende Reste zu vermeiden.

Elektrophorese: Die vorbereiteten Platten werden auf die Kühlplatte der Elektrophoresekammer (Paines & Byrne / Greenford) gelegt. Die beiden Puffertröge sind mit je 2 Liter Barbitalpuffer 0,0375 M pH 8,6 gefüllt. Der Kontakt mit den Puffertrögen wird durch 1mm dickes puffergetränktes Filterpapier hergestellt, wobei zur Vermeidung von schiefen Präzipitaten darauf zu achten ist, daß die Kontaktstreifen nicht breiter sind als die Gelplatte. Mehrere Gelplatten sind auf Stoß aneinanderzureihen und können somit durch je einen Filterpapierstreifen kathoden- und anodenseitig versorgt werden. Nach Aufsetzen des Kammerdeckels kann der Strom eingeschaltet werden. Da der ITI unter den vorliegenden Bedingungen anodenseitig wandert, muß das Netzteil so gepolt werden, daß die Kathode probenseitig liegt. Die Elektrophorese wird über Nacht bei 150 Volt durchgeführt.

Weiterbehandlung und Färbung: Am nächsten Morgen werden die Platten nach Ausschalten des Stromes aus der Kammer genommen und auf Filterpapier gelegt. Die Agaroseschicht wird

mit einer Schicht Filterpapier und darüber einer 1-2 cm dicken Schicht saugfähigen Zellstoffs bedeckt und mit einer dicken Glasplatte beschwert. Durch ständige Erneuerung des saugfähigen Materials und ständig steigende Beschwerung der Glasplatte wird die Flüssigkeit aus den Platten gepreßt.

Nach völliger Trocknung werden die Platten in Coomassie Brilliant Blue R 45 bis 60 Minuten gefärbt:

1 g Coomassie Brilliant Blue R	
90 ml Äthanol 96 %	vor Gebrauch
20 ml Eisessig	filtrieren!
90 ml Aqua dest.	

und anschließend überschüssiger Farbstoff in einem Entfärbbad ausgewaschen:

4,5 Teile Äthanol 96 %
1 Teil Eisessig
4,5 Teile Aqua dest.

Die ge- und entfärbte Platte wird an der Luft, vor dem Heizlüfter oder im Trockenschrank getrocknet.

4. Azocasein-Test

Zum Nachweis von proteolytischer Aktivität wird die Bildung von Trichloressigsäure-löslichen Spaltprodukten beim enzymatischen Abbau von Azocasein anhand der Extinktionszunahme bei 366 nm (Extinktionsmaximum) verfolgt.

0,5 ml der zu testenden Probe und 0,5 ml 3 %iges Azocasein in TRA 0,2 M pH 7,8 werden gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,0 ml 10 %iger Trichloressigsäure läßt man die Gläser noch eine halbe Stunde stehen und zentrifugiert dann. Der Überstand wird bei 366 nm gegen H₂O gemessen.

IV. ERGEBNISSE

A) Elektrofokussierung

1. Ampholine pH-Bereich 3,5 bis 10

Die ersten Versuche wurden mit einem Fraktionierungsbereich von pH 3,5 - 10 und Kathode unten durchgeführt. Je nach pH-Bereich der verwendeten Ampholine-Lösung kann laut Hersteller LKB maximal in jeder Zone zwischen 5 und 25 mg Protein fokussiert werden. Jedoch selbst Mengen von etwa 0,2 mg ITI konnten in 1 %iger und auch 2 %iger Ampholine nicht fokussiert werden, ohne auszufallen. Bei der Elution (60 ml/h, 1 Fraktion/ 4 Minuten) fand sich bei Prüfung mit dem BAPNA-Test der ITI in den Fraktionen, deren pH zwischen 4,0 und 5,0 lag.

2. Ampholine pH-Bereich 4,0 bis 6,0

Das Erscheinen des ITI bei pH 4-5 und die Schwierigkeiten des Ausfallens von Protein ließen das Fortsetzen der Versuche mit einem pH-Fraktionierungsbereich von 4,0 bis 6,0 angebracht erscheinen, in der Hoffnung, in einer somit bei gleicher Säulenlänge und kleinerem pH-Bereich verbreiterten und aufnahmefähigeren ITI-Zone möchte das Protein in Lösung bleiben. Außerdem wurde die Polarität der Elektroden und somit die Richtung des pH-Gefälles in der Säule geändert (jetzt Anode unten), um die ITI-Zone im dichteren Teil des Gradienten zu fokussieren und so ebenfalls einem Ausfallen entgegenzuwirken.

Jedoch auch unter diesen Bedingungen blieb der ITI nicht in Lösung. Die Verwendung eines Glycerin- statt Saccharosegradienten brachte keinen Erfolg. Zusatz des Detergens Tween 20 1 %ig führte sowohl in Saccharose- als auch in Glycerinmedium zu keiner Besserung des Lösungsverhaltens.

Schließlich wurden zur Elektrofokussierung 25 mg vorgereinig-

tes Protein (= 5 mg ITI) in 2,5 ml (1N Essigsäure 1:10 mit Wasser verdünnt und mit 2N NaOH auf pH 4,5 eingestellt) gelöst und ausgefallenes Protein abzentrifugiert. Der Überstand wurde während des Aufpumpens der Säule am erwarteten Ort des späteren Erscheinens dazugepumpt und nicht wie vorher zu der dichten oder leichten Gradientenlösung gegeben. So müssen sich die ITI-Moleküle im elektrischen Feld am wenigsten bewegen. Jedoch auch dieses Verfahren konnte ein Ausfallen des ITI nicht verhindern.

Die Versuchsreihe wurde abgebrochen.

B) ITI-Gewinnung aus Humanserum

1. Chromatographie von Humanserum über DEAE-Servacel SH 23.

Zwei Liter Humanserum von verschiedenen Patienten der Rheumatikerabteilung der Universitätspoliklinik München wurden mit zwei Litern Startpuffer gemischt und mit ca. 220 ml/h auf die Säule gepumpt. Anschließend wurde mit Startpuffer nachgewaschen, bis die Extinktion bei 253 nm fast wieder Ausgangsniveau erreicht hatte und anschließend der Gradient gestartet.

Der BAPNA-Hemmtest (Abbildung 5) zeigt Hemmaktivität bis etwa Fraktion 360:

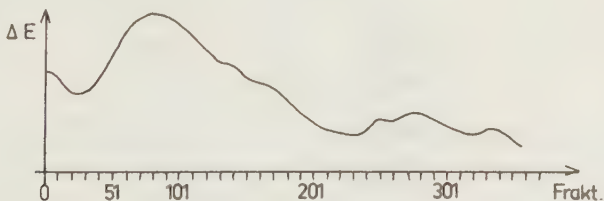


Abbildung 5: Hemmprofil nach der Chromatographie von Humanserum über DEAE-Servacel SH 23.

In der Immunelektrophorese (Abbildung 6) sieht man deutlich

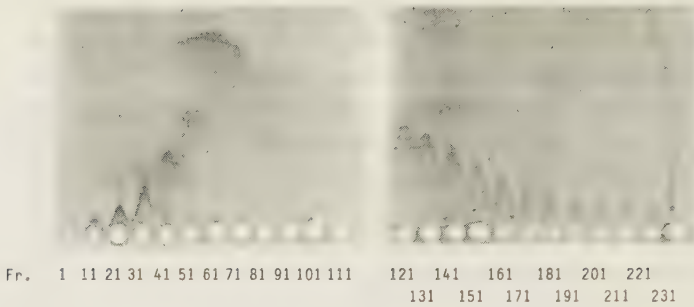


Abbildung 6: Immunelektrophorese nach Laurell, DEAE-Frak-tionen 1 bis 231.

die scharfen spitzen Präzipitate des ITI und etwa ab Fraktion 120 ein zweites, diffuses und stumpferes Präzipitat, das wohl einem I-30-Komplex entspricht, wie die Diskelektrophorese bestätigt, denn dort tritt die Bande des I-30-Komplexes ab Fraktion 120 mit einem Maximum bei Fraktion 170 deutlich auf. Die Bande des ITI läßt sich bis Fraktion 150 verfolgen.

Abbildung 7 zeigt schematisch die Aufeinanderfolge der in der Diskelektrophorese auftretenden Banden mit - soweit bekannt - Identifizierung. Auf eine Wiedergabe der Fotos der in dieser Arbeit erwähnten Flachgele kann verzichtet werden, da die Feinheiten des Bandenmusters im Druck kaum erkennbar sein würden.

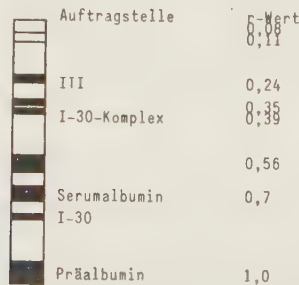


Abbildung 7: Bandenmuster in der Diskelektrophorese

Eine Zusammenfassung der Fraktionen 41 bis 130 ergibt bei hoher ITI-Ausbeute die wenn auch weitgehende, so doch nicht vollständige Abtrennung von anderen Proteinen, zum Beispiel des I-30-Komplexes und des I-30, während andere Proteine, beispielsweise Albumin und Präalbumin noch in größeren Mengen vorhanden sind.

Weitere Reinigungsschritte sind daher erforderlich.

2. Ammonsulfatfällung

Die Fraktionen 41 bis 130 aus der DEAE-Ionenaustauschchromatographie wurden in einer Amicon-Druckkammer (mit Membran PM 10, durchlässig für Moleküle bis MW 10000) auf 200 ml konzentriert, da in der vorhandenen Ultrazentrifuge nicht mehr als 200 ml gleichzeitig bearbeitet werden konnten. Danach wurde unter Eiskühlung und Rühren Ammonsulfat innerhalb von 30 Minuten zugegeben und noch 60 Minuten weitergerührt. Anschließend wurde in der Ultrazentrifuge bei 18000 Umdrehungen pro Minute 30 Minuten lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in insgesamt 80 ml Elutionspuffer für G 200 gelöst.

3. Gelfiltration auf Sephadex G 200

Aus obigen 80 ml wurden ungelöste Anteile durch nochmaliges fünfminütiges Zentrifugieren bei 3000 U/min abgeschieden, der Überstand auf G 200 gegeben und die Elution gestartet (2 Fraktionen à 25 ml/h).

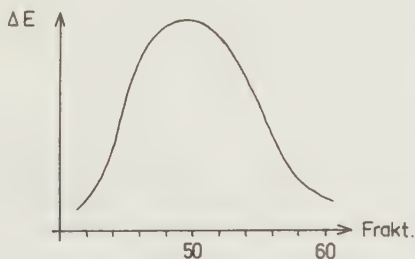


Abbildung 8: Hemmprofil nach der Gelfiltration über G 200

Der BAPNA-Test (Abbildung 8) zeigt einen Peak zwischen Fraktion 40 und 60, wo nach der Diskelektrophorese im wesentlichen ITI und die tiefere Bande des I-30-Komplexes liegen.

Auf den Laurell-Platten (Abbildung 9) sieht man auch einen deutlichen Peak bei Fraktion 40 bis 60. Darunter liegen in den Fraktionen 50 bis 60 diffus schwache Präzipitate (I-30-Komplex, vgl. Abbildung 6). Vor dem ITI-Peak kommen diffuse rauchfahnenartige Präzipitate zur Darstellung, deren Herkunft bisher noch nicht geklärt werden konnte ("Ominosus"). In den Fraktionen 62 bis 72 sieht man scharfe niedrige Präzipitate, im Bereich dieser Fraktionen liegt in der Diskelektrophorese eine Bande, die dem I-30 entspricht.

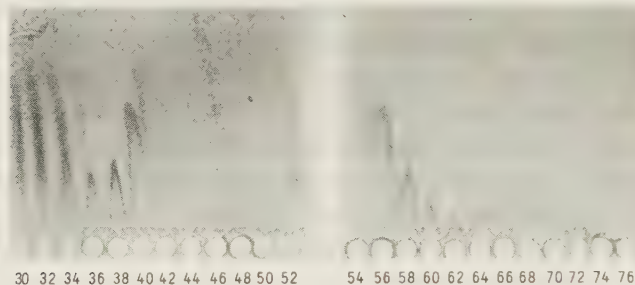


Abbildung 9: Immunelektrophorese nach Laurell, G 200, Fraktionen 30 - 76

Vereinigt wurden die den "Ominosus" enthaltenden Fraktionen 28 - 40, die nur ITI enthaltenden Fraktionen 41 - 49 und die Fraktionen 50 - 60, die ITI und den I-30-Komplex enthalten.

4. Ammonsulfatfällung - Rechromatographie auf DEAE SH 23

Das ITI-Präparat aus den vereinigten Fraktionen 41 - 49 von G 200 war laut Diskelektrophorese zwar schon stark angereichert, jedoch noch nicht einheitlich. Daher wurde das Präparat nochmals ammonsulfatgefällt und auf DEAE rechromatographiert.

Den Hemmtest der rechromatographierten DEAE-Fractionen zeigt Abbildung 10. Es ist nicht erkennbar, ob es sich bei dem Hemmpeak zwischen Fraktion 250 und 360 um einen oder zwei Peaks handelt.

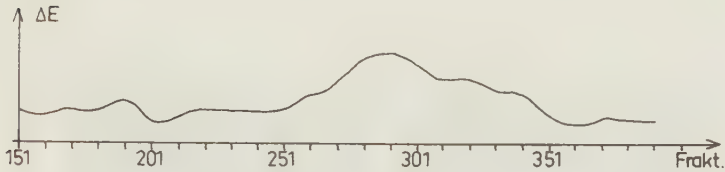


Abbildung 10: Hemmprofil nach Rechromatographie auf DEAE

Die Immunelektrophorese (Abbildung 11) zeigt scharfe Präzipitate, zwischen den Fraktionen 240 und 390 ist überall nur ein Präzipitat erkennbar.

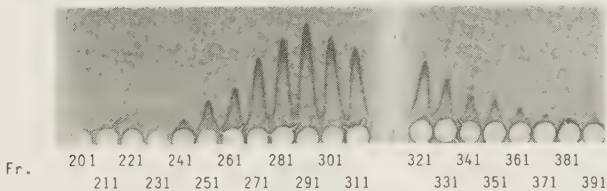


Abbildung 11: Immunelektrophorese nach Laurell, rechrom. DEAE-Fractionen

Laut Diskelektrophorese ist das Material jedoch noch immer nicht sauber. Besonders die tiefere Bande des I-30-Komplexes ist immer noch vorhanden.

5. Affinitätschromatographie an Con-A-Sepharose

Die Entstehungsweise des oben angesprochenen I-30-Komplexes ist wahrscheinlich die Einwirkung einer Protease auf intakten ITI, der so angegriffene ITI zerfällt dann nach Ammonsulfatfällung in diesen Komplex und den I-14.

Somit schien das Problem der Reindarstellung mit einem geeigneten Schritt zur Entfernung der Protease und letztllicher Trennung von ITI und den angegriffenen bzw. zerfallenen ITI-Molekülen gemeistert werden zu können.

In Vorversuchen mit kleineren vorgereinigten ITI-Proben auf Con A stellte sich heraus, daß auf proteolytische Aktivität hinweisende Azocaseinaktivität nur im Durchlauf, Hemmaktivität (ITI) dagegen nur in der Elution zu finden war.

Die vereinigten Fraktionen 261 - 360 aus der letzten DEAE-Chromatographie wurden in der Amicon-Druckkammer (Membran PM 10) entsalzt, einige Male mit 0,1 M Ammoniumacetat pH 8,2 (unter Zusatz von Chlorhexidin) aufgefüllt und wieder konzentriert. Das so entsalzte Material wurde lyophilisiert. In zwei Schritten wurde jeweils die Hälfte der Substanz auf eine Con-A-Säule aufgetragen und chromatographiert.

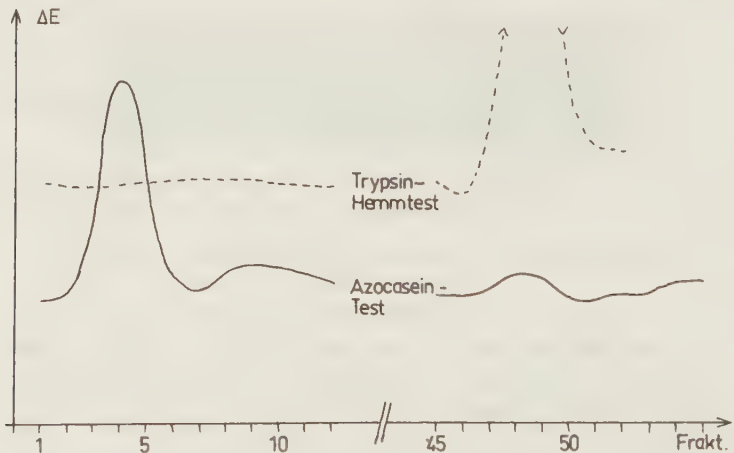


Abbildung 12: Azocaseinaktivität und Trypsinhemmung nach Con-A-Affinitätschromatographie.

Der Vergleich von Azocaseintest und Trypsinhemmttest (Abbildung 12) zeigt im Durchlauf Proteaseaktivität, in der Elution ITI-Aktivität. In beiden Durchläufen beginnt die Trypsin-Hemmung in der 10. Fraktion nach Elutionsbeginn und endet nach 10 bzw. 11 Fraktionen.

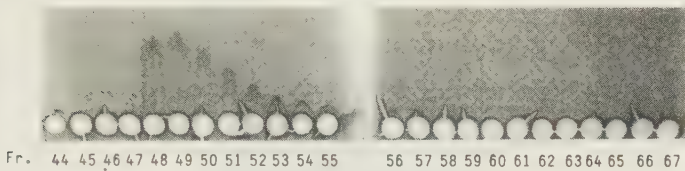


Abbildung 13: Immundiffusionsplatten nach Laurell zu den Con-A-Läufen.

Die Immundiffusionsplatten (Abbildung 13) zeigen in diesem Bereich je zwei Präzipitate, ein kleineres schärferes (ITI) und ein diffuses höheres (1-30-Komplex). Das Diskelektrophoresen-Bandenmuster ist im wesentlichen gleich wie nach der letzten DEAE-Ionenaustauschchromatographie.

Als Bestätigung für die Entfernung der Protease vom ITI-Präparat kann man die Tatsache werten, daß eine Fraktion aus der Elution auch fünf Wochen nach Aufbewahrung im Kühlschrank noch die gleiche Hemmaktivität aufwies, die sie vorher schon hatte, während sonst die Hemmaktivität der Proben infolge Interaktion mit der Protease ständig abnahm und auch bei der Diskelektrophorese einer Probe, die längere Zeit im Kühlschrank gestanden war, das Bandenmuster im Sinne einer Abnahme des ITI und einer Zunahme anderer Banden (= vermehrter ITI-Abbau) verändert war.

Zur endgültigen Trennung des ITI von seinen Bruchstücken dient abschließend eine Gelchromatographie der vereinigten ITI enthaltenden Fraktionen aus den Con-A-Läufen über eine kleine G 200-Säule.

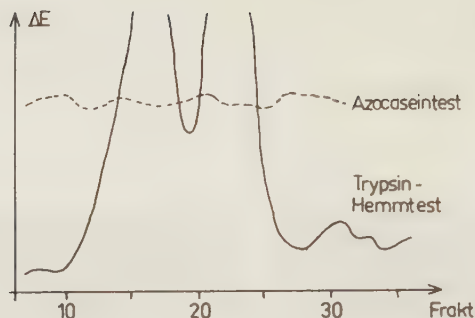


Abbildung 14: Hemmprofil und Azocaseintest der abschließenden G 200-Filtration.

Der Hemmtest hiervon zeigt zwei Peaks zwischen den Fraktionen 11 bis 19 und 19 bis 26 (Abbildung 14). Azocaseinhemmung ist nicht zu finden.

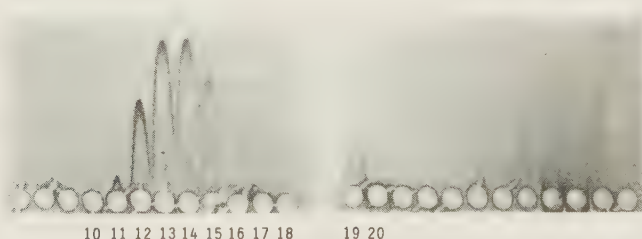


Abbildung 15: Immundiffusionsplatten nach Laurell zur abschließenden G 200-Filtration.

Auf den Immundiffusionsplatten findet man nur zwischen Fraktion 11 und 19 Präzipitate. Hierbei überlagern sich zwei Peaks: Der eine zeigt scharfe Präzipitate (ITI) von 11 bis 19 mit Maximum bei Fraktion 14, der andere zeigt diffuse Präzipitate (I-30) von 14 bis 19 mit Maximum bei 18. In der Diskelektrophorese liegt in den Fraktionen 11 bis 13 nur die ITI-Bande vor.

Die Fraktionen 11 mit 13 wurden vereinigt. Da jedoch das Erscheinen einer einzigen Bande auf der Diskelektrophorese entsprechend der dabei stattfindenden Trennung nach Ladung und Größe nicht absolute Sicherheit über die Homogenität der Probe gibt, wurde von dieser eine zweidimensionale Immunelektrophorese angefertigt. Da auch auf dieser nur ein Präzipitat erkennbar ist (Abbildung 16), darf auf weitgehende Reinheit des gewonnenen ITI geschlossen werden.

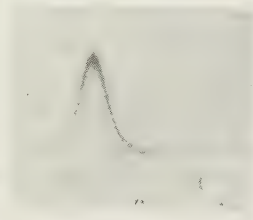


Abbildung 16: Zweidimensionale Immunelektrophorese vom gewonnenen ITI-Präparat.

C) Molgewichtsbestimmung auf Sephacryl S 200

1. Ausgangsmaterial

In einem Vorversuch zur ITI-Reindarstellung ist bei der auf die erste DEAE-Chromatographie folgenden Gelfiltration über G 200 der Elutionspuffer ohne den Zusatz von Benzamidin zubereitet worden. Deshalb konnte sich im Eluat proteolytische Aktivität entfalten. Während die durch DEAE-Ionenaustauschchromatographie gewonnene Probe hauptsächlich ITI enthalten hatte, war nach Gelfiltration bald nur noch wenig ITI zu finden, dafür traten in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese verstärkt Banden auf, die vorher schon abgetrennt worden waren. Die neu entstandenen Banden stellen daher mit Sicherheit Zerfallsprodukte aus dem proteolytischen Abbau von ITI dar.

Zum Zweck der späteren Charakterisierung wurden die ITI enthaltenden Fraktionen aus der G 200-Filtration vereinigt, in einer Amicon-Zelle mit Membran PM 10 konzentriert und anschließend auf einer DEAE SH 23-Säule (30 x 440 mm) chromatographiert. Elutionspuffer und Gradient entsprachen den auf Seite 19 und 21 genannten, die Elutionsgeschwindigkeit betrug 48 ml/h in zwei Fraktionen. Das Hemmprofil des Eluates im BAPNA-Hemmtest zeigt Abbildung 17:

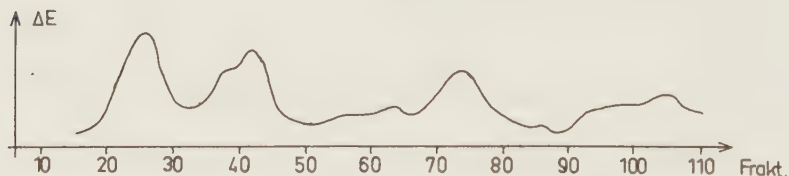


Abbildung 17: Hemmprofil der DEAE-Chromatographie des durch proteolytischen Zerfall aus ITI entstandenen Materials.

Sowohl Hemmtest als auch Laurell-Raketen (Abbildung 18) zeigen in den Fraktionen 20 bis 30 den größten Peak. Um Fraktion 50 und ähnlich um Fraktion 60 sieht man in der Immun-

elektrophorese (ohne Abbildung) schwache Präzipitate, der Hemmtest läßt hier keine bzw. wenig Aktivität vermuten.

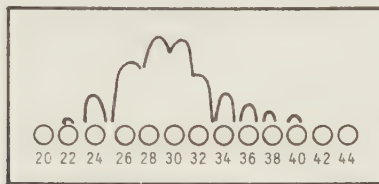


Abbildung 18: Immunelektrophorese nach Laurell der Fraktionen 2-48.

Um Fraktion 75 und 105 liegen weitere Hemmpeaks. Dementsprechend wurden vereinigt die Fraktionen:

- 22 - 30, Weiterverarbeitung siehe S 200, Lauf 1
- 46 - 54, Weiterverarbeitung siehe S 200, Lauf 2
- 56 - 68, Weiterverarbeitung siehe S 200, Lauf 3
- 70 - 80, Weiterverarbeitung siehe S 200, Lauf 4
- 103 - 108, Weiterverarbeitung siehe S 200, Lauf 5

Die Fraktionen 22 - 30, 70 - 80 und 103 - 108 behalten ihre Hemmaktivität auch nach Säurebehandlung, sind also säurestabil.

2. Erstellen einer Eichkurve

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde auf eine 190 x 2 cm große S 200-Säule ein Gemisch von

25 mg IgG vom Rind	MW 160000
25 mg Serumalbumin vom Hund	MW 68000
25 mg Chymotrypsinogen	MW 25700
25 mg Lysozym	MW 14300
10 mg Adenosinmonophosphat	

in 10 ml 0,1 M NH₄Acetat pH 8,2 unter Zusatz von 0,002 % Chlorhexidin und 10⁻⁴ M Benzamidin aufgebracht und mit 14 ml in zwei Fraktionen pro Stunde eluiert. Die Extinktion bei 280 nm wurde auf einem Isco-Schreiber aufgezeichnet. Abbildung 19 zeigt das Elutionsprofil:

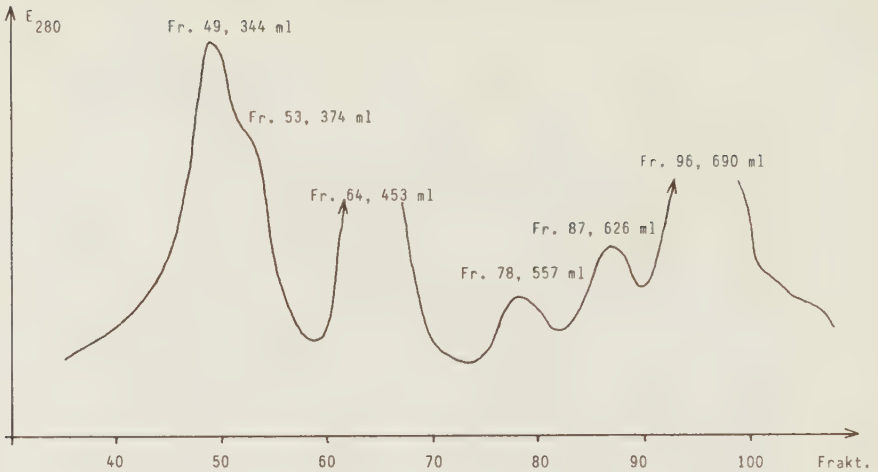


Abbildung 19: Elutionsprofil zum Eichlauf der S 200-Säule

Trägt man auf halblogarithmischem Papier die Molekulargewichte der eingesetzten Proteine gegen das Elutionsvolumen auf, so ist durch diese Punkte die Eichkurve, in diesem Fall, da auf halblogarithmischem Papier, eine Gerade, gegeben (Abbildung 20).

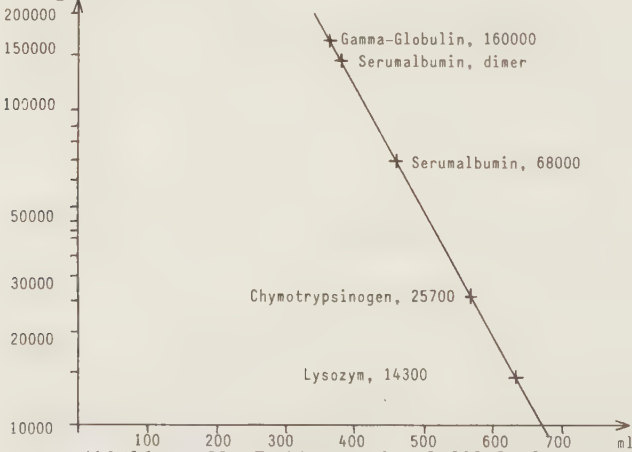


Abbildung 20: Eichkurve der S 200-Säule

3. Molgewichtsbestimmung

Die vereinigten Fraktionen aus oben erwähntem Versuch wurden nach mehrmaligem Verdünnen mit Elutionspuffer und darauf folgendem Konzentrieren über die geeichte S 200-Säule chromatographiert.

a) Lauf 1: DEAE-Fraktionen 22 - 30

Die Laurell-Platten (Abbildung 21) zeigen Präzipitate um Fraktion 58 (≈ 394 ml $\approx$ MW 110000), während im Trypsin-Hemmtest (Abbildung 22) die Maxima der Peaks bei Fraktion 68 (≈ 462 ml $\approx$ MW 62000) und Fraktion 78 (≈ 530 ml $\approx$ MW 38000) liegen.



Abbildung 21: Immunelektrophorese nach Laurell, S 200-Gelfiltration der DEAE-Fraktionen 22 - 30

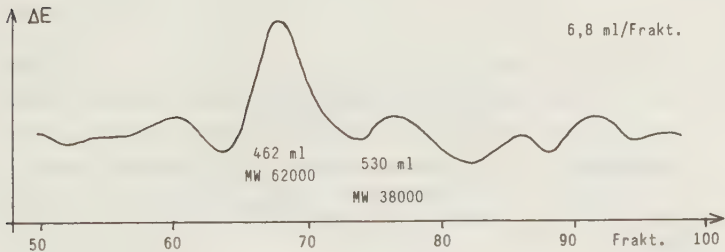


Abbildung 22: Hemmprofil der S 200-Gelfiltration, DEAE-Fraktionen 22 - 30

b) Lauf 2: DEAE-Fractionen 46-54

Die Laurell-Platten zeigen schwache Präzipitate um Fraktion 50. Dort liegt auch der einzige deutliche Hemmpeak des BAPNA-Testes (Abbildung 23). Entsprechend des Elutionsvolumens von 400 ml beträgt das Molekulargewicht 105000.

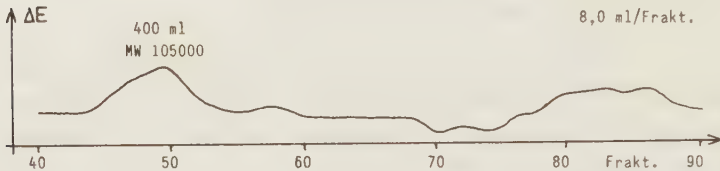


Abbildung 23: Hemmprofil der S 200-Gelfiltration,
DEAE-Fractionen 46-54

c) Lauf 3: DEAE-Fractionen 56 - 68

Auf den Laurell-Platten (Abbildung 24) kommen Präzipitate um Fraktion 46 ($\hat{=}$ 327 ml $\hat{=}$ MW 200000) zur Darstellung. Hemmpeaks (Abbildung 25) liegen um Fraktion 51 ($\hat{=}$ 362 ml $\hat{=}$ MW 148000) und Fraktion 66 ($\hat{=}$ 478 ml $\hat{=}$ MW 53000).



Abbildung 24: Immunelektrophorese nach Laurell, S 200-
Gelfiltration der DEAE-Fractionen 56 - 68

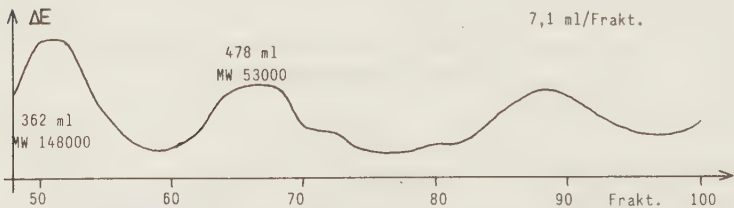


Abbildung 25: Hemmprofil der S 200-Gelfiltration,
DEAE-Fractionen 56 - 68

d) Lauf 4: DEAE-Fraktionen 70 - 80

Die Immunelektrophorese-Platten von diesem Lauf zeigen keinerlei Präzipitate, um Fraktion 58 ($\cong 371 \text{ ml} \cong \text{MW } 136000$) und Fraktion 72 ($\cong 460 \text{ ml} \cong \text{MW } 62000$) sind jedoch deutliche Hemm-peaks erkennbar (Abbildung 26).

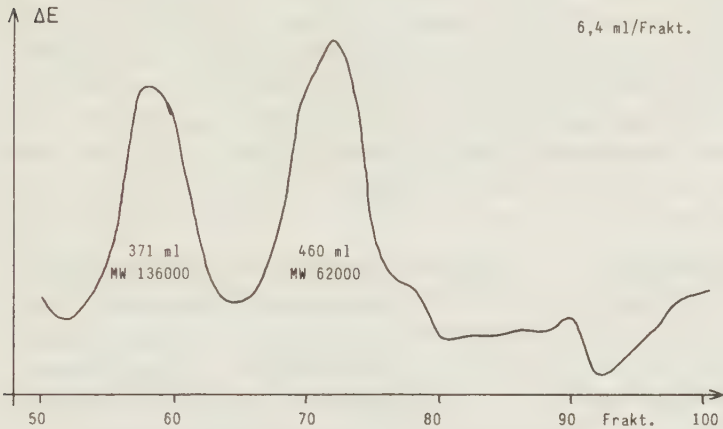


Abbildung 26: Hemmprofil der S 200-Gelfiltration,
DEAE-Fraktionen 70 - 80

e) Lauf 5: DEAE-Fraktionen 103 - 108

Im Hemmprofil dieses Laufes (Abbildung 27) lassen sich nur mit Mühe Peaks ausmachen. Die Laurell-Platten zeigen, wahrscheinlich infolge der zu geringen Antigenmengen, keine Präzipitate. Auf der Diskelektrophorese lassen sich nur um Fraktion 60 $\cong \text{MW } 125000$ Banden ausmachen. Bei Fraktion 71 ($\cong 455 \text{ ml} \cong \text{MW } 62000$) könnte im Hemmprofil ein Peak angedeutet sein.

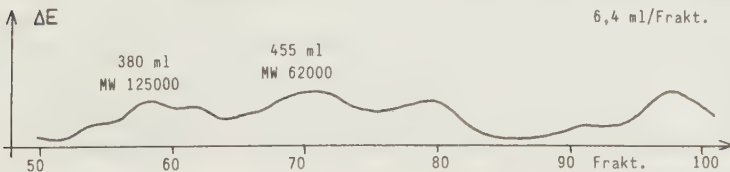


Abbildung 27: Hemmprofil der S 200-Gelfiltration,
DEAE-Fraktionen 103 - 108

V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Bei der Reindarstellung des ITI stellte dessen Instabilität vor große Probleme. Der physikalischen Veränderung des Moleküls wurde durch Kühllhaltung bei allen Versuchsschritten entgegengewirkt. Schwieriger war die Verhinderung proteolytischen Zerfalls, der auch durch Zugabe von Benzamidin zu den Pufferlösungen nicht völlig verhindert werden konnte, da trotzdem jede Aufbewahrung einer Probe Aktivitätsverlust und vermehrte Inhomogenität mit sich brachte. Die Trennung des ITI von seiner Protease war offensichtlich durch DEAE-Ionenaustauschchromatographie, Ammonsulfatfällung und Gelfiltration nicht möglich.

Das Verfahren der Affinitätschromatographie an Con-A-Sepharose dagegen erwies sich als geeignet, die proteolytische Aktivität von den ITI-Präparaten zu trennen. Der so gewonnene ITI erwies sich in Laurell-Immunelektrophorese, Polyacrylamid-Gelelektrophorese und zweidimensionaler Immunelektrophorese als homogen, längere Aufbewahrung im Kühlschrank war ohne Aktivitätsverlust möglich.

In einer vorgereinigten ITI-Probe konnte sich infolge Fehlens von Benzamidin proteolytische Aktivität entfalten und so den ITI zersetzen. Nach Ionenaustauschchromatographie an DEAE Servacel SH 23 wurden die Molekulargewichte der Bruchstücke mittels Gelfiltration über Sephacryl S 200 bestimmt (s. Tabelle Seite 55).

Das im dritten Lauf gefundene Protein 3/1 mit MW 200000 stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit intakten ITI dar (vgl. Steinbuch, Lit. 79), zumal es in der Immunelektrophorese Präzipitate verursacht.

Das Derivat mit MW 110000 bzw. 105000 (1/1 und 2/1) entspricht dem von Hochstraßer (unveröffentlicht) charakterisierten mit ITI-Antikörpern reagierenden säurelabilen Abbauprodukt, das bei der Freisetzung von I-30 aus ITI in vitro und in vivo anfällt (s. S. 13).

ITI - BRUCHSTÜCKE

Lauf Nummer	DEAE-Frakt.	Protein Nummer	Molekulargewicht	Aktivität im Hemmaximum	Präzipitatabildung
1	22- 30	1/1	110 000		+
		1/2	62 000	11,5 ImU/ml	-
		1/3	38 000	7 ImU/ml	-
2	46- 54	2/1	105 000	4,5 ImU/ml	+
3	56- 68	3/1	200 000		+
		3/2	148 000	7,9 ImU/ml	-
		3/3	53 000	3,6 ImU/ml	-
4	70- 80	4/1	136 000	20,6 ImU/ml	-
		4/2	62 000	23,6 ImU/ml	-
5	103-108	5/1	125 000		-
		5/2	62 000		-

Die Bruchstücke 1/2, 4/2 und 5/2 mit MW 62000 sind laut Hochstraßer (36) dem I-30 zuzuordnen.

Merkwürdigerweise bilden nur der ITI selbst (3/1) und das säurelabile Abbauprodukt (1/1, 2/1) Präzipitate in der Immunelektrophorese. An sich sollte zumindest noch der I-30 (1/2, 4/2, 5/2) aufgrund seiner immunologischen Kreuzreaktivität mit dem Inter-Alpha-Trypsininhibitor Präzipitate bilden. Da der I-30 besonders in Lauf 4 in nicht zu geringer Konzentration vorliegt, liegt der Verdacht nahe, daß sich auf einigen Immunelektrophoreseplatten infolge verdorbenen Anti-ITI-Serums keine Präzipitate entwickeln konnten. Somit lassen sich über die Entstehungsweise der übrigen Bruchstücke nur mit Bezug auf das Molekulargewicht und die im gleichen Lauf vorhandenen Fragmente Aussagen machen.

Das Derivat 1/3 mit einem MW von 38000 muß ein stark basisches Protein sein, da das Ausgangsmaterial aus der vorhergehenden Chromatographie auf DEAE aufgrund seiner frühen Elution (Fraktionen 22 - 30) wenig sauer war, der ebenfalls enthaltene I-30 aber stark sauer reagiert. Das säurelabile A bbauprodukt 1/1 kann den I-30 kaum zu so früher Elution veranlaßt haben, da das Ausgangsmaterial des zweiten Laufes

das nur das säurelabile Abbauprodukt enthielt, weniger basisch war als das Ausgangsmaterial zu Lauf 1.

Das Bruchstück 5/1 mit einem MW von 125000 könnte ein I-30-Dimeres sein, insbesondere auch deshalb, weil sein Ausgangsmaterial, die Fraktionen 103 - 108 der DEAE-Chromatographie, aufgrund seines späten Erscheinens stark sauer gewesen sein mußte.

Die Proteine 3/2, 3/3 und 4/1 lassen keine konkreteren Schlüsse zu.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Einbeziehung eines Affinitätschromatographie-Schrittes an Con-A-Sepharose in den Reinigungsprozeß des ITI anschließend an zweimalige DEAE-Ionenaustauschchromatographie, Ammonsulfatfällung und Gelfiltration brachte die Trennung des ITI von einer Protease, die zuvor nicht abgetrennt werden konnte und infolgedessen in vorgereinigten ITI-Präparaten stets zu Aktivitätsabnahme und Entstehung neuer Bruchstücke führte. Der gewonnene ITI stellte sich in Diskelektrophorese und zweidimensionaler Immunelektrophorese als homogen dar.

Die Untersuchung der beim proteolytischen Zerfall eines vorgereinigten ITI-Präparates entstehenden Bruchstücke durch Molekulgewichtsbestimmung, BAPNA-Hemmtest, Immunelektrophorese nach Laurell und Diskelektrophorese führte zur Charakterisierung von ITI, I-30, dem säurelabilen Abbauprodukt mit MW 100000 sowie einem stark basischen Protein mit MW 38000.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alexander P., Block R.J.:
A laboratory manual of analytical methods of protein chemistry / Pergamon Press 1960
2. Ambrus C.M., Back N., Ambrus J.L.:
Circulat. Res. 10, 161 (1962)
3. Astrup T., Sterndorf J.:
Scand. J. clin. Lab. Invest. 7, 239 (1955)
4. Astrup T., Nissen U.:
Nature (London) 203, 255 - 257 (1964)
5. Bauer K.:
Int. J. Prot. Res. 2, 137 - 145 (1970)
6. Bauer K.:
Humangenetik 8, 325 - 329 (1970)
7. Bauer K.:
Humangenetik 8, 357 - 360 (1970)
8. Bauer K.:
Humangenetik 17, 267 - 270 (1973)
9. Bieth J., Aubry M., Travis J.:
Proteinase Inhibitors, Proc. Int. Res. Conf., 2nd
(Bayer Symp. V), 53 (1973)
10. Blatt W.F., Schaefer E.H., Zylber J., Jensen M.:
Circulat. Res. 6, 314 (1958)
11. Bodman J.:
Clin. chim. Acta 3, 108 (1958)
12. Boyde T.R., Pryme J.F.:
Clin. Chim. Acta 21, 9 (1968)
13. Bretzel G., Hochstraßer K.:
Liberation of an Acid Stable Proteinase Inhibitor from
the Human ITI by the Action of Kallikrein,
Z. Physiol. Chem. 357, 487 (1976)
14. Donaldson V.H., Evans P.R.:
Amer. J. Med. 35, 37 (1963)
15. Dyce B., Haverback B.J.:
Amer. J. Gastroent. 34, 481 (1960)
16. Eriksson S.:
Acta med. scand. 177, Suppl. 175 (1965)
17. Faarwang H.J.:
Acta endocrin. 31, 117 (1959)
18. Feeney R.E., Means G.E., Bigler J.C.:
J. Biol. Chem. 244, 1957 (1969)
19. Fermi C., Pernossi L.:
Zschr. Hyg. 18, 83 (1894)

20. Feuth H., Kemkes B., Hochstraßer K.:
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Forum, 133 (1975)
21. Figarella C., Negri G.A., Guy O.:
Proteinase Inhibitors, Proc. Int. Res. Conf. 2nd (Bayer Symp. V), 213 (1973)
22. Finkenstadt W.R., Laskowski M.J.:
J. Biol. Chem. 240, 962 (1965)
23. Finkenstadt W.R., Laskowski M.J.:
J. Biol. Chem. 242, 771 (1967)
24. Fritz H., Brey B., Müller M., Gebhardt M.:
Proteinase Inhibitors, Proc. Int. Res. Conf. 1st, 28 (1970)
25. Fritz H., Heimbürger N., Meier M., Arnold M.,
Zaneveld L.J.D., Schumacher G.F.B.:
Z. Physiol. Chem. 353, 1953-1956 (1972)
26. Ganrot P.O., Bjerre B.:
Acta obst. et gynec. scandinav. 46, 1 (1967)
27. Ganrot P.O.:
Clin. Chim. Acta 15, 113 (1967)
28. Geiringer E.:
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 108, 658 (1961)
29. Hadden J.R., Prout T.E.:
Nature 202, 1342 (1964)
30. Haupt H., Heimbürger N., Krantz, Schwick G.:
Eur. J. Biochem. 17, 254 (1970)
31. Heide K., Heimbürger N., Haupt H.:
Clin. Chim. Acta 11, 82 (1965)
32. Heimbürger N., Schwick G.:
Thromb. Diathes. haemorrh. 7, 432-444 (1962)
33. Heimbürger N.:
XII. Hamburger Symposium über Blutgerinnung, 16. und 17. Mai 1969
34. Heimbürger N., Haupt H., Schwick G.:
Proteinase Inhibitors, Proc. Int. Res. Conf. 1st, Fritz H., Tschesche H., eds. 1 - 21 (1971)
35. Heimbürger N.:
Proteinase Inhibitors, Proc. Int. Res. Conf. 2nd, Bayer Symp. V, 14 (1973)
36. Hochstraßer K., Bretzel G., Feuth H.:
Z. Physiol. Chem. 357, 153-162 (1967)
37. Hochstraßer K., Reichert R., Schwarz S., Werle E.:
Z. Physiol. Chem. 353, 221-226 (1972)
38. Hochstraßer K., Schuster R., Reichert R., Heimbürger N.:
Z. Physiol. Chem. 353, 1120-1124 (1972)
39. Hochstraßer K., Reichert R., Heimbürger N.:
Z. Physiol. Chem. 354, 923-926 (1973)

40. Hochstraßer K., Feuth H., Steiner O.:
Z. Physiol. Chem. 354, 927-932 (1973)
41. Hochstraßer K., Feuth H., Kemkes B., Fall J., Werle E.: Klin. Wschr. 52, 1018 (1974)
42. Hochstraßer K., Feuth H., Fall J., Kemkes B.:
Klin. Wschr. 52, 1015-1017 (1974)
43. Hochstraßer K., Rasche B., Mietens C., Schorn K.,
v. Pilar C.E., Bum A.:
Pneumonologie Suppl. 137-143 (1976)
44. Hochstraßer K., Niebel J., Feuth H., Lempart K.:
Klin. Wschr. 55, 337 (1977)
45. Hochstraßer K., Niebel J., Lempart K.:
Klin. Wschr. 55, 343 (1977)
46. Hochstraßer K., Wachter E., Bretzel G.:
Liberation of Kunitz-type Inhibitors from the Inter-
Alpha-Trypsin-Inhibitor by Limited Proteolysis.
47. Holemans R.:
J. appl. Physiol. 18, 1123 (1963)
48. Jakobsson K.:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5, 97 (1953)
49. Jakobsson K.:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 7, 57 (1955), Suppl. 14
50. Janoff A., Zelios J.D.:
Science 161, 702-704 (1968)
51. Janoff A., Scherer T.:
J. exp. Med. 128, 1137-1151 (1968)
52. Janoff A.:
Lab. Invest. 22, 228-236 (1970)
53. Keil B.:
Structure-Function Relationship of Proteolytic Enzymes,
Desnuelle P., Neurath H., Ottesen M., eds., 102-112
(1970)
54. Kemp J.H., Johnstone J.M.:
Brit. J. Cancer 18, 390 (1964)
55. Kunitz M., Northrop J.H.:
J. Gen. Physiol. 19, 991 (1936)
56. Kunitz M.:
J. Gen. Physiol. 30, 311 (1947)
57. Landsteiner K.:
Zbl. Bakt. 27, 357 (1900)
58. Landureau J.C., Steinbuch M.:
Z. Naturforsch. Teil B 25, 231 (1970)
59. Laurell C.B., Eriksson S.:
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 15, 132 (1963)
60. Mallory P.A., Travis J.:
Biochemistry 12, 2847 (1973)

61. Maurer H.R.:
Disc Electrophoresis and Related Techniques of Poly-
acrylamide Gel Electrophoresis / de Gruyter 1971
62. Ohlsson K.:
Clin. Chim. Acta 32, 399-405 (1971)
63. Orochs G.J., Nordschow C.D.:
Intersoc. 1972, 271.
64. Parisi A.F., Vallee B.L.:
Biochemistry 9, 2421 (1970)
65. Ram J.S., Terminiello L., Bier M., Nord F.F.:
Arch. Biochem. 52, 451 (1951)
66. Reichert R., Hochstraßer K., Werle E.:
Z. Laryng. Rhinol. 51, 190-193 (1977)
67. Rosen F.S., Characke P., Pensky J., Donaldson V.H.:
Science 148, 957 (1965)
68. Sandson J., Hamerman D., Schwick G.:
Trans. Ass. Amer. Physicians 78, 304-313 (1965/66)
69. Schaefer E.H., Walner C.J., Blatt W.F., Jensen J.:
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 98, 345 (1958)
70. Schön H., Rässler B., Alter J.: Clin. Chim. Acta 7,
571 (1962)
71. Schumacher G.F.B., Zaneveld L.J.D.:
Proteinase Inhibitors, Proc. Int. Res. Conf. 2nd, Bayer
Symp. V, 178 (1973)
72. Schumacher G.F.B.:
Personal Communication
73. Schwick H.G., Heimbürger N.:
12. Tagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Blut-
gerinnungsforschung in Deidesheim, 5. April 1968
74. Shulman N.R.:
J. Exp. Med. 95, 593 (1952)
75. De Smith L.S., Lindsley C.H.:
J. Bacteriol. 38, 221 (1939)
76. Steinbuch M.:
Nature 192, 1196 (1961)
77. Steinbuch M., Audran R., Renge C., Blatrix C.:
Protide of Biolog. Fluids 14, 185-188 (1966)
78. Steinbuch M., Audran R.:
C. R. Acad. Sci. 260, 7058 (1965)
79. Steinbuch M., Audran R., Lambin P., Fine J.M.:
"23rd Colloq. on Protides of the Biological Fluids",
H. Peters ed., 115-118 (1975)
80. Steinbuch M.:
In: Methods in Enzymology Vol 45, 760-772 (1976)
81. Travis J.:
Biochem. Biophys. Res. Comm. 44 (1971)

82. Vogel, Trautschold, Werle:
Natürliche Proteasen-Inhibitoren

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. H. Naumann für den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz sowie Herrn Professor Dr. K. Hochstraßer für die großzügige Überlassung des Themas.

Dank schulde ich auch Herrn Dr. G. Bretzel für seine bereitwillige wissenschaftliche Anleitung und Frl. Rossmanith für ihre Mithilfe bei der labortechnischen Durchführung der Untersuchungen.

Lebenslauf

Am 18. August 1956 wurde ich, Lorenz Fischbacher, als zweites Kind des Volksschulrektors Lorenz Fischbacher und seiner Ehefrau Josefa, geborene Landersdorfer, in Rosenheim geboren.

In Rosenheim besuchte ich von 1962 bis 1966 die Volksschule, danach von 1966 bis 1975 das Ignaz-Günther-Gymnasium.

Nach bestandener Reifeprüfung nahm ich im Wintersemester 1975/76 an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Humanmedizin auf. Im August 1977 legte ich die Ärztliche Vorprüfung, ein Jahr später den Ersten Abschnitt und im August 1980 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.

EIN VERFAHREN ZUR REINDARSTELLUNG
DES INTER-ALPHA-TRYPSININHIBITOR
UND CHARAKTERISIERUNG
DER BEI DESSEN ZERFALL
AUFTRETENDEN BRUCHSTÜCKE

Lorenz Fischbacher

